

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-504910

(43)公表日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
H 0 1 L 51/00		8934-4M	H 0 1 L 29/28	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68		0273-2J	G 0 1 N 21/64	Z
G 0 1 N 21/64		0276-2J		33/566
27/447		8824-4E	H 0 5 K 1/02	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-513281
 (86)(22)出願日 平成6年(1994)10月26日
 (85)翻訳文提出日 平成8年(1996)5月1日
 (86)国際出願番号 PCT/US94/12270
 (87)国際公開番号 WO95/12808
 (87)国際公開日 平成7年(1995)5月11日
 (31)優先権主張番号 08/146, 504
 (32)優先日 1993年11月1日
 (33)優先権主張国 米国 (U S)
 (81)指定国 EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, B R, C A, C N, F I, J P, N Z

(71)出願人 ナノゲン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア州、
 サンディエゴ、ソレント・バレー・ロード
 11588、スイート16番
 (72)発明者 ヘラー, マイケル・ジェイ
 アメリカ合衆国92630カリフォルニア州、
 エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ
 1614番
 (72)発明者 チュー, ユージン
 アメリカ合衆国92103カリフォルニア州、
 サンディエゴ、ラーク・ストリート3527番
 (74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 分子生物学的分析および診断用の自己アドレス可能、自己組立て小型電子システムおよびデバイス

(57)【要約】

自己アドレス可能で、自己組み立て超小型電子方式デバイスを設計し製造して、多工程かつ複合した分子生物学的反応を顕微鏡形式で有効に行い制御する。これらの反応には、核酸ハイブリダイゼーション、抗体/抗原反応、診断および生体高分子の合成が含まれる。該デバイスは、微細写真平板およびマイクロ-マシーン加工の両方の技術を用いて製造することができる。特異的結合物質は、核酸およびポリペプチドのごとき分子生物学的分子を包含する。該デバイスは、分析物または反応物の輸送およびアドレスされた特異的微細-位置における反応を順次制御することができる。該デバイスは、分析物および反応物を濃縮し、非-特異的結合分子を除去し、DNAハイブリダイゼーション反応に厳格性の制御を提供し、かつ分析物の検出を改善することができる。該デバイスは、電子工学的に複製することができる。

【特許請求の範囲】

1. 基板、

基板により支持された第1の選択的にアドレス可能な電極、

第1の選択的にアドレス可能な電極に隣接して配置された浸透層、

第1の選択的にアドレス可能な電極に作動可能に接続された電流源、および
浸透層に隣接した付着層

よりなる自己アドレス可能な電子デバイス。

2. 基板により支持されている第2の選択的にアドレス可能な電極をさらに包含する請求項1の電子デバイス。

3. 浸透層上に配置された付着層をさらに包含する請求項1または2の電子デバイス。

4. 基板がベースおよびその上に存在する絶縁材を包含する請求項1の電子デバイス。

5. 基板が以下の群：シリコン、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチック、またはセラミック材から選択される請求項1の電子デバイス。

6. ベースが以下の群：シリコン、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチック、またはセラミック材から選択される請求項4の電子デバイス。

7. ベース材がシリコンである請求項4の電子デバイス。

8. 絶縁材が二酸化ケイ素である請求項4の電子デバイス。

9. 基板が回路パターンまたはボードからなる請求項1の電子デバイス。

10. 第1の選択的にアドレス可能な電極および第2の選択的にアドレス可能な電極が基板により支持された絶縁材により分離されている請求項2の電子デバイス。

11. 絶縁材が以下の群：二酸化ケイ素、プラスチック、ガラス、レジスト、ゴム、またはセラミック材から選択される請求項10の電子デバイス。

12. 窒化ケイ素が絶縁材上に配置されている請求項10の電子デバイス。

13. 電流源が直流源である請求項1の電子デバイス。

14. 浸透層がアミノプロピルトリエトキシシランである請求項1の電子デバ

イス。

15. 浸透層および選択的にアドレス可能な電極がバッファー貯留層により分離されている請求項1の電子デバイス。

16. 電極が以下の群：アルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、半導体材料、およびそれらの混合物から選択される請求項1の電子デバイス。

17. 基板、
基板上に配置された複数の選択的にアドレス可能な電極、
電流源、
電流源からの選択的電流経路を提供する、電極への電氣的接続、および
アドレス可能な結合位置を形成する、各電極に隣接した浸透層
からなる自己アドレス可能な電子デバイス。

18. さらに該電流源を該アドレス可能な電極に選択的に接続するためのスイッチコントローラーからなる請求項17の電子デバイス。

19. さらにアドレス可能な結合位置を形成する、該浸透層上に配置された付着層からなる請求項17の電子デバイス。

20. 電極材が以下の群：アルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、半導体材料、およびそれらの混合物から選択される請求項17の電子デバイス。

21. 該複数の選択的にアドレス可能な電極間に配置された電子絶縁材をさらに包含する請求項17の電子デバイス。

22. 複数のアドレス可能な結合位置がアレイ中に配置されている請求項17の電子デバイス。

23. 結合物質、試薬、および分析物を含有する溶液を保持するための空洞をさらに包含する請求項17の電子デバイス。

24. 特異的結合物質が選択的に輸送され、該アドレス可能な結合位置に結合しており、アドレスされた能動的な位置デバイスを形成する請求項17の電子デバイス。

25. デバイス上の結合位置の幅が0.5ミクロンないし200ミクロンの間である請求項17の電子デバイス。

26. デバイス上の結合位置の幅が5ミクロンないし100ミクロンの間である請求項17の電子デバイス。

27. 基板、
基板上に配置された複数の選択的にアドレス可能な電極、
電流源、
電流源からの選択的電流経路を提供する、電極への電氣的接続、
該電極に連結された個々のバッファ貯留層、
アドレス可能な結合位置を形成する、該個々のバッファ貯留層に隣接して配置された個々の浸透層
からなる自己アドレス可能な電子デバイス。

28. さらに結合物質、試薬、および分析物を含有する溶液を入れておくための共通の貯留層からなる請求項27の電子デバイス。

29. さらにアドレス可能な結合位置を形成する、該浸透層上に配置された付着層からなる請求項27の電子デバイス。

30. 該アドレス可能な結合位置がアレイ中に配列されている請求項27の電子デバイス。

31. 浸透層が官能化された親水性ゲル、膜、および多孔性材料からなる群より選択される請求項27の電子デバイス。

32. 特異的結合物質が選択的に輸送され、該アドレス可能な結合位置に結合し、アドレスされた能動的な位置デバイスを形成する請求項27の電子デバイス。

33. デバイス上の位置の幅が50ミクロンないし2センチメートルの間である請求項27の電子デバイス。

34. デバイス上の位置の幅が100ミクロンないし5ミリメートルの間である請求項27の電子デバイス。

35. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを結合位置に対して電子工学的に制御する

方法であって、以下の工程：

下に存在する第1の電極を包含する第1の結合位置および下に存在する第2の電極を包含する第2の結合位置に接触させて溶液を置き；

該第1の結合位置を該第2の結合位置に対して正電位に置き、該第1の位置表面上でDNAを濃縮し；次いで、

該第1の結合位置を該第2の結合位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1の結合位置から非特異的結合DNA配列を除去するに十分であるが特異的結合DNA配列を除去するには十分でないことを特徴とする方法。

36. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを第1および第2の結合位置に対して電子工学的に制御する方法であって、以下の工程：

第1、第2、および第3の位置に接触させて溶液を置き；

該第1および第2の結合位置を正の電位に置き、該第3の位置を負の電位に置き、該第1および第2の位置においてDNAを濃縮し；

該第1および第2の特異的結合位置を負の電位に置き、該第3の位置を正の位置に置き；次いで、

該第1および第2の結合位置を該第3の位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1および第2の位置から非特異的結合DNA配列を除去するに十分であるが特異的結合DNA配列を除去するには十分でないことを特徴とする方法。

37. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを第1の結合位置、次いで、第2の特異的結合位置に対して電子工学的に制御する方法であって、以下の工程：

該第1、第2、および第3の位置に接触させて溶液を置き；

該第1の結合位置を正の電位に置き、該第2の結合位置を負の電位に置き、該第1の位置においてDNAを濃縮し；

該第1の結合位置を負の電位に置き、該第2の結合位置を正の電位に置き、該

第2の位置においてDNAを濃縮し；次いで、

該第1および第2の結合位置を該第3の結合位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1および第2の位置から非特異的結合DNAを除去するに十分であるが特異的結合DNAを除去するには十分でないことを特徴とする方法。

38. 該負の電位または電流が漸次増加または減少される請求項37のハイブリダイゼーション法。

39. 多数の特異的および非特異的DNA配列が結合位置のアレイに適用される請求項36または37の方法。

40. DNAを溶液から複数の位置へ能動的に輸送する方法であって、以下の工程：

DNAを含有する溶液を第1、第2、第3、およびn個の位置と接触させて置き；

他の位置に対して正の電位を該第1の位置に提供し、DNAを該第1の位置に輸送し；

該第1の位置に対して正の電位を該第2の位置に提供し、DNAを該第2の位置に輸送し；

該第2の位置に対して正の電位を該第3の位置に提供し；次いで、

該プロセスをn個の位置すべてについて繰り返すことを特徴とする方法。

41. 生体高分子の組み合わせ合成のための電子工学的に制御された方法であって、以下の工程：

それぞれが個々に電子工学的にアドレス可能な複数の反応位置を基板上に形成し；

各反応位置上に付着層を形成し；

該反応位置を荷電モノマーA含有溶液と接触させて置き；

反応Aが起こるようにそれらの位置をモノマーAと逆の電荷に選択的に偏倚

させ、反応Aが起こらないようにそれらの位置をモノマーAと同じ電荷に偏倚させ；

特定のA位置においてモノマーAを濃縮し反応させ；

未反応モノマーA含有溶液を除去し；

該反応位置を荷電モノマーB含有溶液に接触させて置き；

反応Bが起こるようにそれらの位置をモノマーBと逆の電荷に選択的に偏倚させ、反応Bが起こらないようにそれらの位置をモノマーBと同じ電荷に偏倚させ；

特定のB位置においてモノマーBを濃縮し反応させ；次いで、

すべての生体高分子配列が完成するまでモノマーA、モノマーB、ないしモノマーNについてn回反応を繰り返すことを特徴とする方法。

42. 特定のDNA配列でアドレスされた自己アドレス可能な電子デバイスを複製する方法であって、以下の工程：

マスター自己アドレス可能電子デバイス上にアドレスされた特定のDNA配列に相補的な配列をハイブリダイゼーションさせ；

受容自己アドレス可能電子デバイス上のアドレスされていない位置を、該マスターデバイス上のアドレスされた位置に揃え；次いで、

該マスターデバイス上の位置を負に偏倚し、該受容デバイス上の位置を正に偏倚し、相補的配列を該受容デバイスに輸送させることを特徴とする方法。

43. さらにマスター鑄型からの相補的配列を変性させることからなる、請求項42のパターン化配列の複製方法。

44. 2個またはそれ以上のアドレス可能な位置；および

少なくとも1個の該位置に隣接して配置された検出システム
からなる、蛍光または比色分析法による結合反応およびアッセイの検出システム。

45. 検出器が以下の群：フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、または光電子倍增管から選択される光電子的検出器である請求項44の検出システム。

46. 検出器が以下の群：荷電カップルドデバイス、冷却された荷電カップルドデバイス、増強された荷電カップルドデバイス、またはマイクロチャンネルデ

バイスから選択されるオプトエレクトロニクスのイメージング検出器である請求項44の検出システム。

47. 検出器が蛍光輻射のエミッションを検出するものである請求項44の検出システム。

48. 検出器が分光測光学的輻射の吸収を検出するものである請求項44の検出システム。

【発明の詳細な説明】

分子生物学的分析および診断用の自己アドレス可能、自己組立て小型電子システムおよびデバイス

発明の分野

本発明は、顕微鏡形式において多工程で複式の反応を能動的に行うことができる自己アドレス可能な自己組立て小型電子システムの設計、製造および使用に関する。特に、これらの反応には、核酸ハイブリダイゼーション、核酸増幅、試料調製、抗体／抗原反応、臨床的診断、および生体高分子合成のごとき分子生物学的反応が含まれる。

発明の背景

分子生物学は核酸および蛋白質の分析のための広範囲の技術よりなり、そのうちの多くは、臨床的診断アッセイの基礎を形成する。これらの技術には、核酸ハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、遺伝子配列分析、ならびに核酸および蛋白質の分離および精製が含まれる(例えば、ジェイ・サムブルック(J. Sambrook)、イー・エフ・フリッシュ(E. F. Fritsch)およびティー・マニアティス(T. Maniatis)、「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor, New York)のコールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)社、1989年)。

多くの分子生物学的技術には、非常に多くの試料につき膨大な数の操作を行うことが含まれている。それらは、しばしば、複雑で時間がかかり、一般に高い精度が要求される。多くの技術は、感度、特異性または再現性の欠如によってその適用が制限されている。例えば、感度および特異性に伴う問題は、これまで、核酸ハイブリダイゼーションの実際的な適用を制限してきた。

核酸ハイブリダイゼーション分析には、一般的に、大量の非標的核酸の中から非常に少数の特異的標的核酸(DNAまたはRNA)をプローブで検出することが含まれる。高い特異性を維持するためには、通常は、温度、塩、洗剤、溶媒、

カオトロピック剤および変性剤の種々の組合せにより達成される最も厳格な条件下でハイブリダイゼーションを行う。

複数試料の核酸ハイブリダイゼーション分析は、種々のフィルターおよび固体支持体の形式で行われてきた(ジイ・エイ・ベルツ(G. A. Beltz)ら、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)第100巻 B部、アール・ウー(R. Wu)、エル・グロスマン(L. Grossman)、ケイ・モルダブ(K. Moldave)編、ニューヨーク(New York)、アカデミック・プレス(Academic Press)社、第19章、266-308頁、1985年)。1つの形式、いわゆる「ドットプロット」ハイブリダイゼーションには、フィルターへ標的DNAを非共有結合させ、引き続いてこれをラジオアイソトープで標識したプローブ(群)とハイブリダイズさせることが含まれる。「ドットプロット」ハイブリダイゼーションは広範囲の用途を獲得しており、多くのバージョンが開発された(エム・エル・エム・アンダーソン(M. L. M. Anderson)およびビー・ディー・ヤング(B. D. Young)、「核酸ハイブリダイゼーション-実践的アプローチ(Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach)」ビー・ディー・ハーメス(B. D. Hames)およびエス・ジェイ・ヒギンズ(S. J. Higgins)編、ワシントンDC(Washington D. C.)、アイアールエル・プレス(IRL Press)社、第4章、73-111頁、1985年参照)。該ハイブリダイゼーション法は、さらに、ゲノム突然変異の多重分析用(ディー・ナニブシャン(D. Nanibhushan)およびディー・ラビン(D. Rabin)、1987年7月8日、欧州特許出願第0228075号)ならびに重複クローンの検出用およびゲノム地図作製用(ジイ・エイ・エバンス(G. A. Evans)、1993年6月15日、米国特許第5,219,726号)にも開発されている。

もう1つの形式、いわゆる「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションには、固体支持体にオリゴヌクレオチド・プローブを共有結合させ、次いでそれを用いて

複数の核酸標的を捕捉し検出することが含まれる(エム・ランキ(M. Ranki)ら、ジーン(Gene)第21巻、77-85頁、1983年；エイ・エム・パルバ(A. M. Palva)、ティー・エム・ランキ(T. M. Ranki)およびエイチ・イー・ソーダー

ルンド(H. E. Soderlund)、1985年10月2日、英国特許出願GB2156074A号；ティー・エム・ランキ(T. M. Ranki)およびエイチ・イー・ソーダールンド(H. E. Soderlund)、1986年1月7日、米国特許第4,563,419号；エイ・ディー・ビー・マルコム(A. D. B. Malcolm)およびジェイ・エイ・ランデール(J. A. Langdale)、1986年7月3日、PCT WO 86/03782；ワイ・スタビンスキー(Y. Stabinsky)、1988年1月14日、米国特許第4,751,177号；ティー・エイチ・アダムス(T. H. Adams)ら、1990年2月22日、PCT WO 90/01564；アール・ビー・ワラス(R. B. Wallace)ら、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)第11巻、3543頁、1979年；およびビー・ジェイ・コナー(B. J. Connor)ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)第80巻、278-282頁、1983年)。

最近の核酸ハイブリダイゼーション形式および厳格性の制御方法を用い、最も高感度のレポーター基(酵素、蛍光発色団、ラジオアイソトープ等)および結合検出系(フルオロメーター、ルミノメーター、フォトン・カウンター、シンチレーション・カウンター等)を用いる場合でさえ、低コピー数(すなわち、1~100,000個)の核酸標的を検出することは依然困難である。

この困難さは、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションに関連して生じる幾つかの問題によって引き起こされる。第1のかつ最も重大な問題は、ハイブリダイゼーション反応の厳格性の制御に関連している。ハイブリダイゼーション反応は、ハイブリダイゼーションの特異性を達成するために、通常、最も厳格な条件下で行われる。厳格な制御の方法には、第一義的には、ハイブリダイゼーションにおける温度、イオン強度および変性剤の最適化、および続く洗浄法が含まれる。残念なことには、これらの厳格な条件を適用すると、検出するためのハイブリダ

イズ・プローブ/標的複合体の数の顕著な減少が起こる。

第2の問題は、大部分の試料、特にヒトゲノムDNA試料中のDNAが非常に

複雑なことに関連する。試料が、特異的標的配列に酷似した膨大な数の配列よりなる場合には、最もユニークなプローブ配列でさえ、非-標的配列と多数の部分的高ブリダイゼーションを起こす。

第3の問題は、プローブとその特異的標的との間の好ましくない高ブリダイゼーション動力学に関連する。最良の条件下でさえ、大部分の高ブリダイゼーション反応は、相対的に低濃度のプローブおよび標的分子で行われる。加えて、プローブはしばしば標的核酸に対する相補鎖と競合する。

現在の大部分の高ブリダイゼーション形式に関する第4の問題は、高レベルの非-特異的バックグラウンド・シグナルである。これは、ほとんどいずれの物質にもDNAプローブが親和性を有することによって引き起こされる。

これらの問題が個々に、または組み合わさって、前記形式の核酸高ブリダイゼーションの感度および/または特異性を喪失させる。大部分の核酸を基礎とする臨床的診断アッセイには低コピー数の核酸標的を検出することが必要であるため、このことは残念である。

低コピー数の核酸標的を検出することが困難なために、研究界は標的核酸配列を増幅させるためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に大きく依存している(エム・エイ・インニス(M. A. Innis)ら、「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」、アカデミック・プレス(Academic Press)社、1990年)。たとえ、どんなに長期を要し厄介な工程であっても、PCR反応によって作製した膨大な数の標的核酸配列によって、続いての直接的核酸プローブ技術が改善される。

直接的プローブで低コピー数の標的核酸を検出することの一般的な困難さに対する特徴的な例外は、イン・サイチュ・高ブリダイゼーション技術である。この技術によって、低コピー数のユニークな核酸配列を個々の細胞で検出することができる。イン・サイチュ形式においては、比較的高い局所濃度で細胞($\sim 20-50 \mu\text{m}^2$)または核($\sim 10 \mu\text{m}^2$)の領域に標的配列が自然に閉じ込められる。

さらに、プローブ/標的高ブリダイゼーション・シグナルは、顕微鏡的および形態学的に異なった領域に限定され；このことによって、固体支持体上における

ハイブリダイゼーションよりも、人工的または非特異的シグナルから陽性シグナルを容易に区別することができる。

ある種の態様でイン・サイチュ・ハイブリダイゼーションを模倣することによって、微細形式化した複合装置またはマトリックス装置(例えば、DNAチップ)にて多重試料核酸ハイブリダイゼーション分析を行う新しい技術が開発されている(エム・バリナガ(M. Barinaga)、サイエンス(Science)第253巻、1489頁、1991年；ダブリュ・ベインズ(W. Bains)、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology)第10巻、757-758頁、1992年参照)。これらの方法は、通常、DNAチップの微細ウェルのごとき固体支持体の非常に小さな特異的領域に特異的DNA配列を結合させる。これらのハイブリダイゼーション形式は、従来の「ドット・ブロット」および「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション系の微細スケールのバージョンである。

微細形式化ハイブリダイゼーションを用いれば、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」(SBH)(エム・バリナガ(M. Barinaga)、サイエンス(Science)第253巻、1489頁、1991年；ダブリュ・ベインズ(W. Bains)、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology)第10巻、757-758頁、1992年参照)を行うことができる。SBHは、全ての可能なn-ヌクレオチド・オリゴマー(n量体)を使用して、未知のDNA試料中のn量体を同定することができ、続いてそれをアルゴリズム分析によって並べて、DNA配列を作製する(アール・ドーマナック(R. Drmanac)およびアール・クルクベンジャコフ(R. Crkvenjakov)、ユーゴスラビア国特許出願#570/87、1987年；アール・ドーマナック(R. Drmanac)ら、ゲノミクス(Genomics)第4巻、114頁、1989年；ステレゾスカ(S trezoska)ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)第88巻、10089頁、1991年；およびアール・ドーマナック(R. Drmanac)およびアール・ビー・クルクベンジャコフ(R. B.

Crkvenjakov)米国特許第5,202,231号、1993年4月13日)。

SBHを行うには2つの様式がある。第1の形式には、支持体上に全ての可能

なn量体アレイ(array)を作製し、次いで、これを標的配列とハイブリダイズさせることが含まれる。これは、リバース・ドット・プロットのバージョンである。第2の形式には、標的配列を支持体に結合させ、これを全ての可能なn量体で順次釣り上げることが含まれる。両形式とも、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションの基本問題および複合ハイブリダイゼーションに関するさらなる困難性を有している。

サザン(Southern)、英国特許出願GB8810400号、1988年；イー・エム・サザン(E. M. Southern)ら、ゲノミクス(Genomics)第13巻、1008頁、1992年では、DNAを分析しまたはDNAを配列決定するのに第1の形式を使用することが提案されている。サザン(Southern)は、PCR増幅させたゲノムDNAを用いて既知の単一点突然変異を同定した。また、サザンは、SHB用の固体支持体上にオリゴヌクレオチドのアレイを合成する方法も記載している。しかしながら、サザンは、アレイ上の各オリゴヌクレオチドに対して、最適な厳格性の条件をどのようにして達成するかについては触れていない。

フォドール(Fodor)ら、ネイチャー(Nature)第364巻、555-556頁、1993年では、固体支持体上の1,024個の8量体のオリゴヌクレオチドのアレイを用いてDNA配列を決定している。この場合において、標的DNAは、AおよびC塩基のみを含有する蛍光標識した一本鎖の12量体オリゴヌクレオチドであった。アレイ上の8量体オリゴマーとのハイブリダイゼーションには、1 pmol濃度($\sim 6 \times 10^{11}$ 分子)の12量体標的配列が必要であった。この結果は多くの誤対合を示した。サザンと同様に、フォドール(Fodor)らも、複合ハイブリダイゼーションについての厳格性の制御のごとき、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションの基本的な問題には触れていなかった。これらの問題は、大量の単純12量体標的の必要性和合わさって、このSHB形式がかなり制限されることを示している。

最近、ドーマナック(Drmanac)ら、サイエンス(Science)第260巻、

1649-1652頁、1993年は、前記した第2形式を用いて幾つかの短い(116bp)DNA配列を配列決定した。標的DNAは膜支持体に結合させた

(「ドット・プロット」形式)。各フィルターを272個の標識した10量体および11量体オリゴヌクレオチドと順次ハイブリダイズさせた。広範な厳格性の条件を用いて、各n量体プローブの特異的ハイブリダイゼーションが達成された；洗浄時間は5分間～一晚、温度は0℃～16℃で変化させた。大部分のプローブは、16℃にて3時間洗浄することが必要であった。ハイブリダイゼーション・シグナルを検出するため、フィルターは2～18時間感光させる必要があった。標的配列が単純であり、オリゴマーの設定を減少させ、かつ利用できる最も厳格な条件を用いたにも拘わらず、全体として偽陽性ハイブリダイゼーション率は5%であった。

フォードール(Fodor)ら、サイエンス(Science)第251巻、767-773頁、1991年は、写真平板技術を用いてマトリックス上にオリゴヌクレオチドを合成した。ピルング(Pirrung)ら、米国特許第5,143,854号、1992年9月1日は、シリコン基板上のアレイ様式にてのポリペプチドの大規模写真平板固相合成法を教示している。

マトリックス・ハイブリダイゼーションのもう1つのアプローチにおいて、ビーティエ(Beattie)ら、「1992年サンジエゴ会議：遺伝子認識(The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition)」1992年11月では、微細ロボット工学システムを用いて、特異的DNA配列を含有する微小液滴をガラス基体上の個々の微細加工試料ウェルに滴下させた。各試料ウェルにおけるハイブリダイゼーションは、交流(AC)電場で各個別超微小ウェルを取り囲んだ、ミニチュア電極試験固定体を応答指令信号を送ることによって検出する。

形式に拘わらず、現行の微細スケールのDNAハイブリダイゼーションおよびSHBのアプローチは、直接的なプローブのハイブリダイゼーションに関連する物理的な問題を克服していない。それらは、非常に高レベルの比較的短い一本鎖標的配列またはPCR増幅DNAを必要とし、最も厳格な条件下でさえ高レベルの偽陽性ハイブリダイゼーション・シグナルを生じる。短かいオリゴヌクレオチ

ド配列のアレイを用いた複合形式の場合においては、いずれの従来アプローチを用いても各個別の配列につき厳格な条件を最適化することはできない。何故なら

ば、これらの形式に用いるアレイまたはデバイスでは、他の位置に比して個別の位置で温度、イオン強度または変性剤を変化させまたは調整できないからである。従って、共通の厳格性の条件をデバイス上の全ての配列に用いなければならない。このことによって、多数の非-特異的および部分的ハイブリダイゼーションが生じ、デバイスの適用が非常に限定される。アレイ上の異なる配列の数が増加し、配列長が減少するに従い、問題はより複雑となる。このことは、多数の短鎖オリゴヌクレオチド・プローブを必要とするSBHについては特に厄介である。

異なったサイズ、電荷または立体構造の核酸は、電場におけるそれらの異なった移動度によりハイブリダイゼーション種を区別できる電気泳動技術によって、日常的に分離される。パルスフィールド電気泳動は、媒質(例えば、ゲル)の周りの複数の電極配列を用いて、従来のゲル電気泳動系によっては分離できない非常に大きなDNA断片を分離する(アール・アナンド(R. Anand)およびイー・エム・サザン(E. M. Southern)、「核酸のゲル電気泳動-実践的アプローチ(Gel Electrophoresis of Nucleic Acids-A Practical Approach)」第2版、ディー・リックウッド(D. Rickwood)およびビー・ディー・ハーメス(B. D. Hames)編、ニューヨーク(New York)のアイアールエル・プレス(IRL Press)社、101-122頁、1990年参照)。

ペース(Pace)、米国特許第4,908,112号、1990年3月13日は、微細加工技術を用いてシリコン基板上にキャピラリー・ゲル電気泳動系を作製することを記載している。複数電極は、該系に組み込まれていて、該デバイス内の分離媒質を通して分子を移動させる。

ソアネ(Soane)およびソアネ(Soane)、米国特許第5,126,022号、1992年6月30日は、多数の電極を用いれば、管中に含まれるゲル分離媒質を通して混合物中の荷電分子の線形移動を制御することができることを記載している。分離媒質中の分子の移動および位置を制御するには、電極を管内に設置しなければならない。

ワシズ,エム(Washizu, M.)およびクロサワ,オウ(Kurosawa, O.)アイイーイー・イー・トランザクションズ・オン・インダストリー・アプリケーションズ(I

E E E Transactionson Industry Applications)第6巻、1165-1172頁、1990年は、高周波数交流(AC)電場を用いて、微細加工電極間に生じる電場列(line)の方向にDNAを向けた。しかしながら、直流(DC)電界をそれらの研究に使用することはできない。ワシズ(Washizu)、ジャーナル・オブ・エレクトロスタティクス(J. Electrostatics)第25巻、109-123頁、1990年には、二重電気泳動(dielectrophoresis)を用いた細胞および生物分子の操作が記載されている。細胞を融合でき、微細-電極構造間のAC電圧によって生じた電場列に沿って生物分子を方向付けることができる。しかしながら、二電気泳動工程には、非常に高周波数のAC(1MHz)電圧と低導電率の媒質とが必要である。これらの技術は、AC電場列に沿って異なったサイズのDNA分子を方向付けることができるが、それは同じサイズのハイブリダイゼーション複合体同志を区別することができない。

前記より明らかなごとく、複数工程かつ複合の分子生物学的反応を行う有効な技術を提供するために、膨大な試行がなされてきた。しかしながら、前記の理由によって、これらの技術は不十分であることが証明された。有効な技術に対する要望が長い間認識されてきたにも拘わらず、今まで満足のいく解法は提唱されていない。

発明の概要

本発明は、顕微鏡形式において制御された複数工程かつ複合の反応を能動的に行うことができる、プログラム可能で、自己アドレス可能な自己組立て微細電子システムおよびデバイスの設計、製造および使用に関する。これらの反応には、限定するものではないが、核酸ハイブリダイゼーション、抗体／抗原反応、および関連する臨床的診断のごとき大部分の分子生物学的反応が含まれる。加えて、特許請求するデバイスは、多工程の組み合わせ生体高分子合成も行うことができ、それらには、限定するものではないが、特異的超微小位置での異なったオリゴヌ

クレオチドまたはペプチドの合成が含まれる。

特許請求するデバイスは、微細リソグラフィーおよび微細加工技術の両方を用

いて製造する。該デバイスはアドレス可能な顕微鏡位置のマトリックスをその表面に有しており；各個別の微細位置は、特異的結合物質(例えば、核酸、抗体)のそれ自体への輸送および結合を電子工学的に制御し指定できる。全ての微細位置は、それらの特異的結合物質でアドレスされうる。これらのデバイスを用いれば、該システムは最小限の外部介入にて自己組立て可能である。

該デバイスは、種々のアッセイおよび反応を制御することができ、かつ能動的に行うことができる。分析物または反応物は、自由フィールド電気泳動によっていずれかの特異的微細-位置まで輸送でき、そこでその分析物または反応物は効率的に濃縮され、特異的結合物質と反応する。特異的な分析物または反応物を検出する感度は、濃縮効果のために改善される。いずれの非-結合分析物または反応物も、微細-位置の極性を逆転させることによって除去することができる。かくして、当該デバイスはアッセイおよび反応の特異性も改善する。

該デバイスは、特定の微細-位置におけるハイブリダイゼーション反応のための個々の厳格性の制御を提供する。かくして、マトリックス上のすべての微細-位置は同時に異なる厳格性を有することができ、最適条件において複数のハイブリダイゼーションを行うことができる。

また、デバイスは、組み合わせた光学的(蛍光、または分光光度測定)なイメージング検出系または組み込まれたセンシング素子を用いることによって、各微細-位置でハイブリダイズした複合体を容易に検出できる。

さらに、該デバイスの能動的な性質は、最小の外部からの物理的操作により複雑な多段階反応を行うことを可能にする。所望ならば、特定の結合体に向けられたマスターデバイスをもう1つの基盤デバイスに電氣的に複製またはコピーすることができる。

かくして、特許請求するデバイスでは、多工程かつ複合した反応を完全かつ正確な電子工学的制御で、好ましくは全体マイクロプロセッサ制御で行う(すなわち、コンピューターによって行う)ことができる。多工程かつ複合した反応

の速度、特異性および感度は、特許請求するデバイス上の各特異的微細-位置において顕著に改善されている。

本発明は、発明の背景に記載された複数試料のハイブリダイゼーション用のアレイおよびデバイスの限界を克服するものである。以前の方法およびデバイスは実際のハイブリダイゼーションプロセスに関しては機能的に受動的である。精巧な写真平板技術を用いてアレイを作製し、あるいは超小型電子検知素子を検出用に組み込むことができるが、従来のデバイスは現実のハイブリダイゼーション工程を制御しまたは影響を与えない。それらは、ハイブリダイゼーション反応に関連する物理的な問題を克服するために設計されていない。

本発明は、本発明の目的に適合するすべてのサイズまたは形態の微細-位置を利用することができる。本発明の好ましい具体例において、ミリメートル以下の範囲の微細-位置を用いる。

「特異的結合物質」とは、一般的に、共有結合または非共有結合を介して他の分子、高分子または細胞に対して特異的な親和性を有する生物学的分子または合成分子を意味する。好ましくは、特異的結合物質には、それを微細-位置表面の共通官能基に共有結合または非共有結合させ得る(自然にまたは修飾による)官能化学基(第一級アミン、スルフヒドリル、アルデヒド等)、共通配列(核酸)、エピトープ(抗体)、ハプテンまたはリガンドが含まれる。特異的結合物質には、限定するものではないが：デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、合成オリゴヌクレオチド、抗体、蛋白質、ペプチド、レクチン、修飾多糖、細胞、合成複合高分子、機能性ナノ構造物、合成ポリマー、修飾/ブロックしたヌクレオチド/ヌクレオシド、修飾/ブロックしたアミノ酸、蛍光発色団、発色団、リガンド、キレートおよびハプテンが含まれる。

「厳格性の制御」とは、特異的および非特異的な結合相互作用を区別できる能力を意味する。

かくして、本発明の第一かつ最も重要な態様は、電子工学的にプログラム可能で自己アトレス指定可能な顕微鏡位置のアレイを有するデバイスである。各顕微鏡位置には、基板によって支持される下部作動性直流(DC)微細-電極が含まれ

る。各微細-位置の表面は、小さな対イオンが自由に輸送される浸透層、および特異的結合体が共有結合する付着層を有する。

「アレイ」または「マトリックス」とは、デバイス上のアドレス指定可能な位置の配列を意味する。該位置は、二次元アレイ、三次元アレイ、または他のマトリックス形式で配置することができる。位置の数は、数個から少なくとも数十万までの範囲とすることができる。各位置は、全体的に独立した反応部位を表している。

第2の態様において、本発明は、結合物質をデバイス上のいずれかの特異的微細-位置に輸送する方法をその要旨とする。活性化されれば、微細-位置は、いずれの荷電した機能性特異的結合物体のそれ自体までの自由フィールド電気泳動的輸送にも影響を及ぼすことができる。特異的微細-位置と接触すると、機能化された特異的結合物質が直ちにその特異的微細-位置の付着層表面に共有結合する。他の微細-位置も、荷電分子に対して反対の電位にそれらを維持することによって、同時に保護することができる。該プロセスは、全微細-位置がそれらの特異的結合性物質でアドレスされるまで、迅速に繰り返すことができる。

「荷電機能化特異的結合物質」とは、化学反応性(すなわち、位置に共有結合できる)であって、正味荷電(+または-のいずれか)に帯電していることを意味する。

第3の態様において、本発明はデバイス上のいずれかの特異的微細-位置で分析物または反応物を濃縮させ、反応させる方法をその要旨とする。特異的結合物質が付着した後も、各微細-位置の下部微細電極は直流(DC)モードで機能し続ける。このユニークな特徴によって、溶液中に遊離した比較的希薄な荷電分析物または反応物分子を、該分析物または該反応分子に対して反対の電荷に維持されているいずれの特異的微細-位置においても順次または並行様式で、迅速に輸送し、濃縮し、反応させることができる。特異的微細-位置は、分析物または反応物分子と同じ電荷でそれを維持することによって保護または遮断することができる。選択した微細-位置で希薄な分析物または反応分子を濃縮するこの能力によって、これら微細-位置における反応速度を顕著に加速することができる。

所望の反応が完了したら、微細-電極の電位を逆転させて、該微細-位置から非特異的分析物または未反応分子を除去することができる。

特異的分析物または反応生成物は、いずれの微細-位置からも放出し、さらなる分析のために他の位置に輸送することができ；あるいは、他のアドレス可能な位置に保存でき；あるいは、該システムから完全に除去することができる。

特異的微細-位置における分析物の続いての分析も、これらの位置から非特異的物质を反発させる能力によって、顕著に改善される。

第4の態様において、本発明は：

- ハイブリダイゼーションが起こる特異的微細-位置(群)において、希薄標的DNAおよび/またはプローブDNA配列を迅速に濃縮し；

- ハイブリダイゼーションが起こった特異的微細-位置(群)から、非-特異的に結合した標的DNA配列を迅速に除去し；

- ハイブリダイゼーションが起こった特異的微細-位置(群)から、競合する相補的標的DNAを迅速に除去し；

- 電位を上昇させて部分的にハイブリダイズしたDNA配列(1塩基を超える誤対合)を除去し；

- 電位を調整して単一誤対合ハイブリダイゼーションに対する解析能を改善し(例えば、それにより点突然変異を同定する)；

- 同じバルク溶液中で起こる個々のハイブリダイゼーションに対して個々の電位を調整し；次いで

- 電位の調整を用いて非増幅標的DNA配列が捕捉オリゴヌクレオチド・プローブのアレイにハイブリダイズするのを改善する

工程よりなる、核酸ハイブリダイゼーション反応の厳格性の制御を改善する方法をその要旨とする。

第5の態様において、本発明は、微細-位置において生体高分子を合成する方法を特徴とする。

第6の態様において、本発明は、マスターデバイスを複製する方法を特徴とする。

第7の態様において、本発明は、関連する光学的、オプトエレクトロニクスのまたは電子工学的な検出システムを有する自己-アドレス指定された超小型電子

技術デバイス、または統合された光学的、オプトエレクトロニクスのまたは電子工学的な検出システムを有する自己-アドレス指定された超小型電子技術デバイスを用いて、アドレス指定された微細-位置で起こる反応を検出し分析する方法を特徴とする。

図面の簡単な説明

図1はマイクロリソグラフィ技術を用いて作製した3つの自己アドレス指定可能な微細-位置の断面図である。

図2はマイクロリソグラフィ的に作製した微細-位置の断面図である。

図3は実際に作製し、オリゴヌクレオチドでアドレス指定し、試験した自己アドレス指定可能な64個の微細-位置チップの模式図である。

図4は特異的なオリゴヌクレオチドを微細-位置の付着表面に迅速に共有結合させる特定の付着化学過程を示している。

図5は微細-機械加工した96個の微細-位置デバイスの引き延ばしたダイアグラムである。

図6は微細-機械加工したデバイスの断面図である。

図7は特定の微細-位置で分析物または反応分子を電子工学的に濃縮するのに使用するデバイスの機構を示している。

図8は3つの特異的なオリゴヌクレオチド結合物質(SSO-A、SSO-BおよびSSO-C)を有するデバイスの自己指定された組立てを示している。

図9は特異的なDNA捕捉配列を含有する微細-位置で濃縮される試料/標的DNAの電子工学的に制御されたハイブリダイゼーション工程を示している。

図10は電子工学的に指定された逐次ハイブリダイゼーション工程を示している。

図11は単一の点突然変異を決定するハイブリダイゼーション工程の電子工学的な厳格性の制御(ESC)を示している。

図12は標識DNAプローブを用いることなく、すなわち電子工学的に制御された蛍光染料検出プロセスによって、ハイブリダイズしたDNAを検出するスキームを示している。

図13はデバイスの電子工学的に制御された複製のスキームを示している。

図14はオリゴヌクレオチドの電子工学的に指向された組合せ合成のスキームを示している。

発明の詳細な説明

本発明のデバイスおよび関連する方法論によって、分子生物学的反応および診断反応を完全な電子制御下に行うことができる。本発明の基本的概念は、プログラム可能であってアドレス指定可能な顕微鏡位置を有する超小型電子技術デバイスである。各微細-位置は、特異的結合物質が共有結合する誘導化された上面(すなわち、付着層)、中間浸透層、および下部直流(DC)微細電極を有している。基本超小型電子技術構造を最初に作製した後、該デバイスは特異的結合性物質で各特異的微細-位置のアдресシングを自己指定することができる。自己アドレスされたデバイスは、続いていずれかのその微細-位置において、多段階、組み合わせ、および複数の反応を能動的に行うことができる。デバイスは、そのいずれの微細-位置への、またはそこからの分析物および反応物の迅速な移動および濃縮を、電子工学的に指定し制御することができる。種々の反応の動的態様を電子工学的に制御するデバイスの能力によって、多数の新しい機構ならびに重要な利点および改善点が提供される。

本発明の概念および具体例を3つのセクションで記載する。第1のセクション「基本デバイスの設計および作製」は、基本的な下部超小型電子技術デバイスの設計、およびマイクロリソグラフィおよびマイクロマシーン加工技術の双方を用いた該デバイスの加工を記載している。第2のセクション「デバイスの自己指定されたアドレスシング」は、デバイスの自己アドレスシングおよび自己組立て、特に各微細-位置への特異的結合物質の迅速な輸送および付着を記載している。第3のセクション「デバイスの適用」は、デバイスが種々の多工程の、組合わされた、複合の反応をいかに電子制御するかを記載している。また、このセクションは、デバイスの種々の用途および適用を記載している。

(1) 基本デバイスの設計および作製

デバイスに複数工程かつ複雑な反応を行わせるために、その重要な電子部品は

水溶液中で能動的な作動を維持できなければならない。この要件を満たすために、各微細-位置は下部の制御可能かつ機能性のDCモードの微細-電極を有していなければならない。デバイスの設計および作製に関する他の考慮には、限定するものではないが、物質適合性、特異的結合物質および続く反応物および分析物の性質、および微細-位置の数が含まれる。

「機能性のDCモード微細電極」とは、荷電した特異的結合物質、反応物、または分析物を該デバイスのいずれかの位置への、またはそこから、あるいは試料溶液における自由フィールド電気泳動輸送に影響するか、またはそれを引き起こすことができる、直流モード(連続またはパルス of いずれか)で操作される、正または負のいずれかに偏倚した微細電極を意味する。

本発明の範囲内で、分子の自由フィールド電気泳動輸送は、絶縁材によって結合されるか、または制限されて作り出される電場に依存していない。

デバイスは、2つくらいの少ないアドレス可能な微細位置、または数十万ほど多くの微細位置を有するように設計することができる。一般的には、多数の微細位置を有する複合デバイスは、マイクロリソグラフィー技術を用いて加工される。加工は、ケイ素、またはガラス、二酸化ケイ素、プラスチックもしくはセラミック材のごとき他の適当な基板材料上で行う。これらの超小型電子技術「チップ」の設計は、考慮された大規模のアレイまたは複合分析デバイスであろう。少数の微細位置またはマクロ位置を有するデバイスは、マイクロマシーン加工技術を用いて加工されよう。

アドレス可能な微細位置は、いずれの形状とすることもでき、好ましくは、円形、正方形または長方形とすることができる。アドレス可能な微細位置のサイズは、いずれのサイズとすることもでき、好ましくは、ミクロン以下($\sim 0.5 \mu\text{m}$)

\sim 数センチメートル(cm)で、マイクロリソグラフィー技術を用いて作製するデバイスには $5 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ が最も好ましい範囲で、マイクロマシーン加工技術を用いて作製するデバイスには $100 \text{ pm} \sim 5 \text{ mm}$ が最も好ましいサイズである。マイクロリソグラフィー法の分解能よりも小さな微細位置を作製するために

は、電子ビーム・リソグラフィー、イオンビーム・リソグラフィーまたは分子ビーム・エピタクシーのごとき技術が必要であろう。顕微鏡位置は分析および診断型の適用には望ましいが、限定するものではなく、分取用スケールの生体高分子の合成には、より大きなアドレス可能な位置(例えば、2 mmより大きい)が望ましい。

マイクロリソグラフィーおよび/またはマイクロマシーン加工技術を用いることによって微細位置を作製した後に、化学的方法を用いて特別の付着層および浸透層を作る。これらの重要な構造によって、各微細位置表面下のDCモードの微細電極が：(1)特異的(荷電)結合物質が1の微細位置表面から他の微細位置表面への、あるいはバルク溶液から特異的微細位置への自由フィールド電気泳動輸送に影響するか、またはそれを引き起こすことができ；(2)特異的結合物質を特異的微細位置の特別に修飾された表面へ濃縮し共有結合させることができ；(3)他の反応物および分析物が制御された様式にて微細位置へ、またはそこから輸送されるように、特異的結合物質を付着させた後にDCモードで能動的に機能させ続けることができる。

設計パラメーター(マイクロリソグラフィー)

図1はマイクロリソグラフィー技術を用いて加工した自己アドレス可能な微細位置の基本設計を示す。3つの微細位置(10)(ML-1、ML-2、ML-3)が、絶縁材層/基板材上に沈着させてある金属部位(12)上の表面に形成されている。金属部位(12)は下部微細電極構造(10)として作用する。絶縁材は、金属部位(12)を相互に隔離する。絶縁材には、限定するものではないが、二酸化ケイ素、ガラス、レジスト、ゴム、プラスチックまたはセラミック材が含まれる。

図2はマイクロリソグラフィーにより作製した金属部位(12)上に形成させた個々の微細位置(10)の基本的特徴を示している。アドレス可能な微細位置が金属部位(12)上に形成され、酸化層(20)、浸透層(22)、付着層(24)および結合物質層(26)を組み込んでいる。浸透層の共有結合カップリングのために、金属酸化物層は、ベースを供する。浸透層によって、金属表面および付着および

/結合物質層の間に間隔が設けられ、これは、溶媒分子、小さな対イオン、および電解反応ガスが金属表面へ、またはそこから自由に通過できるようにする。マイクロリソグラフィーにより作製したデバイスの浸透層の厚さは、約1ナノメートル(nm)~100ミクロン(μm)、最も好ましくは2nm~1 μm の範囲とすることができる。付着層によって、結合物質の共有結合用の基板が提供される。マイクロリソグラフィーにより作製したデバイスの付着層の厚さは、0.5nm~1 μm 、最も好ましくは1nm~200nmとすることができる。ある種の場合においては、該浸透層および付着層は、同一の材から形成させることができる。特異的結合物質は、付着層に共有結合し、特異的結合物質層を形成する。該特異的結合物質層は、通常、単層の特異的結合分子である。しかしながら、ある場合においては、該結合物質層は数層または多層の結合分子を有することができる。

浸透層および付着層のある種的设计および機能態様は、物理的(例えば、サイズおよび形)および特異的結合性物質分子の特性によって支配される。また、それらは、続いて微細位置まで輸送され、それに結合するであろう反応物および分析物分子の物理学および化学的特性によってある程度指示される。例えば、オリゴヌクレオチド結合物質は、DCモード機能の損失を引き起こすことなしに、1つの型の微細位置表面に付着することができ、すなわち、該下部微細電極は、下部電気泳動輸送は、オリゴヌクレオチド結合性物質が付着する表面に、またはそこから他の分子の迅速な自由フィールド電気泳動輸送をまだ引き起こすことができる。しかしながら、大きな球状蛋白質結合物質(例えば、抗体)が同じ型の表面に付着する場合、それらは、表面を絶縁し、DC様式機能の低下または完全な喪失を引き起こし得る。大きな結合物質(例えば、大きな球状蛋白質)の数が減少するか、または表面上の結合物質間をとるよう、付着層の適当な修飾を行わなければならないであろう。

微細位置間の間隔は、作製の容易さ、微細位置間の検出分解能の要件、および装置上の望ましい微細位置数によって決定される。しかしながら、微細位置(すなわち、下部微細電極)のいずれの組合せでも完全なデバイス領域上で操作でき

る点において、微細位置間の特定の間隔、または微細位置の空間配置もしくは構造は、デバイス機能に必要でない。あるいは、誘電体断材でデバイスを封じ込めることも、微細位置を完全に隔離することも必要ではない。このことは、複合電子フィールドのパターンまたは誘電体境界が、いずれかの電極間の空間または媒質中で特異的分子を選択的に移動し、分離し、固定し、または方向付ける必要がないためである。特異的結合分子ならびに続く分析物および反応物がアドレス可能な微細位置の表面に付着することによってデバイスはこのことを達成する。自由フィールド電気泳動の推進力によって、デバイス上のいずれかの位置および全位置の間のいずれの荷電分子の迅速かつ直接的な輸送が供される。

数百個を超えて微細位置の数が増加するにしたがって、該微細位置の下部回路の複雑性も増大する。この場合においては、微細位置のグルーピングパターンを変化させ、空間距離も比例的に増加させなければならず、あるいは複層回路を基礎デバイス中に作製することができる。

特異的結合物質でアドレスした微細位置に加えて、他の機能を提供するいくつかのアドレスされない、あるいは平面的な微細位置が該デバイスには含まれているであろう。これらの微細位置を試薬の保存、反応物もしくは分析物一時的に保存に使用ことができ；さらに、過剰量の反応物、分析物または試料中の他の阻害成分のための使い捨てユニット(すなわち、試薬調剤系および試料調製系)として用いることができる。他の非アドレス微細位置をアドレスされた微細位置と組み合わせて使用して、これらの特異的微細位置で生じる反応に作用または影響することができる。これらの微細位置は、デバイス間およびデバイス内の活性および制御の双方に付加される。2つの離れたデバイス間で相互作用し輸送することも微細位置には可能である。このことによって、保存デバイスからの結合物質または反応物で作動デバイスをロードする機構、およびデバイスをコピーまた複製する機構が提供される。

図3は、64個のアドレス可能な微細位置(30)を含有するマトリックス型のデバイスを示している。64個の微細位置デバイスは簡便な設計である。それは、標準的な超小型電子技術チップ・パッケージング構成要素と嵌合する。かかる

デバイスは、64個の微細位置を含有する $750\mu\text{m} \times 750\mu\text{m}$ の中枢領域で、約 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ のケイ素チップ基板上に作製する。各微細位置(32)は、近隣の微細位置と $5\mu\text{m}$ 離れている約 $50\mu\text{m}^2$ である。各個々の下部微細電極用の接続回路は、金属接触パッド($300\mu\text{m}^2$)(34)の外側周辺部($10\text{mm} \times 10\text{mm}$)を走っている。せり上がった内側周辺部は、微細位置を有する領域および接触パッドの間に形成でき、約 $2 \sim 10\mu\text{l}$ の試料溶液を保持できるキャビティを形成する。「チップ」は標準クアドパッケージ中にマウントすることができ、チップ接触パッド(34)は該クアドパッケージのピンに配線する。次いで、パッケージングしたチップは、該デバイスを制御し操作できるマイクロプロセッサ制御DC電力供給源およびマルチメーター器具に接続することができる。

作製手順 (マイクロリソグラフィ)

マイクロリソグラフィ作製工程

一般的なマイクロリソグラフィ技術または写真平板技術を、膨大な数の小さな微細位置を有する複合「チップ」型デバイスの作製に用いることができる。デバイスの作製には複雑写真平板技術は必要でないが、材の選択、および水溶液中で電子工学的デバイスを有効に機能させるという要件には特別な配慮がまさに必要である。

図3に示す64個の微細位置デバイス(30)は、相対的に単純なマスク設計および標準的なマイクロリソグラフィ技術を用いて作製することができる。一般的に、基板材は $1 \sim 2\text{cm}^2$ のシリコン・ウェハまたは厚さ $0.5\mu\text{m}$ のチップであろう。シリコンチップは、プラズマ加熱化学蒸気沈着(PECVD)によって適用する、厚さ1ないし $2\mu\text{m}$ の二酸化ケイ素(SiO_2)絶縁コートで最初に保護膜形成する。

次工程において、真空蒸発によって $0.2 \sim 0.5\mu\text{m}$ の金属層(例えば、アルミニウム)を沈着させる。アルミニウムに加えて、回路に適当な金属および材料には、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素および種々の金属の組合せが含まれる。絶縁基板材(SiO_2)に適当に粘着させる特別な技術は異なる金属に

関して用いる。

次に、チップを正荷電のフォトレジスト(シプレー(Shipley)、マイクロポジットAZ1350J)で保護膜形成し、回路パターンでマスク(明場(light field))し、露光し現像する。該フォトレジストを除去し、露光アルミニウムをエッチングする。今度は、アルミニウム回路パターンをチップ上に残しつつ、レジストのアイランドを除去する。これには、金属接触パッドの外側周辺部、接続回路(配線)、およびアドレス可能な微細位置の下部基板として供される微細電極の中核アレイが含まれる。

PECVDを用いると、該チップを最初に0.2~0.4ミクロンの SiO_2 層で、次いで0.1~0.2ミクロンの窒化ケイ素(Si_3N_4)層で保護膜形成する。次いで、チップを正のフォトレジストで被覆し、接触パッドおよび微細電極位置用にマスクし、露光し現像する。フォトレジストを除去し、 SiO_2 および Si_3N_4 層をエッチングしてアルミニウム接触パッドおよび微細電極を露光する。次いで、周囲のアイランド・レジストを除去すると、接触パッドおよび微細電極の間の接続配線が SiO_2 および Si_3N_4 層によって絶縁されたまま残る。

SiO_2 および Si_3N_4 層は該デバイスの機能性に重要な特性を供する。第二の SiO_2 層はアルミニウム回路とのより良好な接触および改善された密閉性を有する。また、レジスト材を用いて絶縁し密閉することもできる。このことによって、微細電極が作動開している際の電解効作用による回路の掘削が防がれる。 Si_3N_4 を、被覆する最終表層として用いる。なぜなら、特異的結合物質に付着する微細電極表面を修飾するために引き続き使用される試薬に対してそれが顕著に反応性が低いためである。

浸透層および付着層形成工程

この時点で、デバイス上の微細電極位置は、特殊化した浸透層および付着層で修飾する準備ができている。このことは本発明の重要な態様である。目的は、選択的な拡散特性を有する中間浸透層および最適な結合特性を有する付着表面層を微細電極上に作製することである。該付着層は特異的結合物質が付着するために

、平方ミクロン (μm^2) 当たり $10^5 \sim 10^7$ 個の官能基化位置を有すべきである。しかしながら、特異的結合物質の付着は、官能化から下部微細電極が保護されるよう、表面を保護膜形成または絶縁してはならない。官能化デバイスには、ある画分 ($\sim 5\%$ ないし 25%) の能動的金属微細電極表面が溶媒 (H_2O) 分子に依然として接近でき、かつ対イオン (例えば、 Na^+ および Cl^-) および電解ガス (例えば、 O_2 および H_2) の拡散が生じ得ることが必要である。

また、中間浸透層も拡散が生じるように設計されている。加えて、該浸透層は、微細電極表面との物理学的接触から大きな結合物質、反応物および分析物を阻害または妨害するポア限界特性を有していなければならない。浸透層は、微細位置の結合物質とは物理学的に異なる能動的微細電極表面を維持している。

主要なデバイス機能の見地からすると、この設計によって、電気泳動輸送に要する電解反応を微細電極表面上で生じさせることができるが、結合物質、反応物および分析物に対する不利な電気化学効果が回避される。

金属微細電極表面の誘導体化のための 1 の好ましい方法はアミノプロピルトリエトキシシラン (APS) を使用する。APS は、金属およびシリコン表面上で酸化物および/またはヒドロキシル基と容易に反応する。APS は、引き続いての結合物質の共有結合のための第一級アミン基で、浸透層および付着層を結合させる。表面結合部位によって、APS は、わずかに酸化されたアルミニウム表面上に相対的に高いレベルの官能化 (すなわち、多数の第一級アミン)、 SiO_2 表面上に中間レベルの官能化、および Si_3N_4 表面の非常に制限された官能化を生じさせる。

APS 反応は、全デバイス (例えば、チップ) 表面をトルエン中の 10% APS 溶液で 50°C にて 30 分間処理することによって行う。次いで、該チップをトル

エン、エタノール中で洗浄し、次いで 50°C にて 1 時間乾燥する。該微細電極金属表面は、多数の第一級アミン基 ($10^5 \sim 10^6 / \mu\text{m}^2$) で官能化する。今度は、結合物質を、誘導化した微細電極表面に共有結合することができる。

APS 法はオリゴヌクレオチド結合物質の付着によく作用する。図 4 は、3'-末端アルデヒド誘導化オリゴヌクレオチド (40) を APS 官能化表面 (42) へ付

着させる機構を示している。これは1つのアプローチを表しているが、多くのタイプの結合物質の共有結合的および非共有結合的双方の付着に関しては種々の他の付着反応も可能である。

設計および作製（マイクロマシーン加工）

このセクションでは、マイクロマシーン加工技術（例えば、穿孔、粉碎等）または非リソグラフィー技術をいかに用いてデバイスを作製するかを記載する。一般的に、これらのデバイスは、マイクロリソグラフィーによって作製されるものよりも相対的に大きな微細位置(> 100ミクロン)を有する。これらのデバイスは、分析適用、ならびに生体高分子合成のごとき、分取型の適用に用いることができる。大きなアドレス可能な位置は、多量の結合物質を運搬するために三次元形式（例えば、管またはシリンダー）で作製することができる。かかるデバイスは、限定するものではないが、プラスチック、ゴム、シリコン、ガラス（例えば、微細チャンネル、マイクロキャピラリー等）またはセラミックスを包含する種々の材を用いて作製することができる。マイクロマシーン加工デバイスの場合、接続回路および大きな電極構造は、当業者に知られている標準的な回路ボード・プリンティング技術を用いて材上にプリントすることができる。

アドレス可能な微細位置デバイスは、マイクロマシーン加工技術を用いて比較的容易に作製することができる。図5は、96個の微細位置デバイスの模式図である。この微細位置デバイスは、材を通して均整をとって間隔を空けた96個の孔（直径1mm）を穿孔することによって、適当な材料台材（2cm×4cm×1cm）から作製する。電極回路ボード（52）は、微細位置構成要素（54）の上面に正確に嵌合する薄シートのプラスチック材台材上に形成する。回

路ボードの下面には、各微細位置（55）への個々の配線（プリント回路）が含まれる。短い白金電極構造（～3-4mm）（62）は、個々の微細位置チャンバー（57）まで延びるよう設計されている。該プリント回路配線は、適当な防水性絶縁材で被覆されている。プリント回路配線はソケットに収束し、これにより複合スイッチ・コントローラー（56）およびDC電力供給源（58）に接続される。デバイスは共通緩衝液貯蔵器（59）中に部分的に浸漬しており、その中で作動する。

マイクロマシン加工技術およびマイクロリソグラフィ技術によって作製したデバイス中の微細位置の主機能は同一であるが、それらの設計は異なっている。マイクロリソグラフィによって作製したデバイスにおいては、浸透層および付着層を下部金属微細電極上に直接的に形成する。マイクロマシン加工技術によって作製したデバイスにおいては、浸透層および付着層は、個々のチャンバーまたは容器(57)中の緩衝溶液によって、それらの個々の金属電極構造(62)から物理的に離されている(図6参照)。マイクロマシン加工デバイスにおいては、該浸透層および付着層は、官能化親水性のゲル、膜、または他の適当な多孔性材を用いて形成できる。

一般的に、結合した浸透層および付着層の厚さは、 $10\mu\text{m}\sim 10\text{mm}$ の範囲である。例えば、26%～35%の(0.1%ポリリジンを有する)ポリアクリルアミド修飾親水性ゲルを用いて、デバイス中の各個々の微細位置チャンバーを部分的に充填する($\sim 0.5\text{mm}$)ことができる。このゲル濃度は、ポア限界 $2\text{nm}\sim 3\text{nm}$ を有する理想的な浸透層を形成する。ゲル中に取り込まれたポリリジンによって、特異的結合物質の続く付着のための第一級アミン官能基が供される。この型のゲル浸透層によって、DC様式で電極を能動的に機能させることができる。電極が活性化された場合には、ゲル浸透層は、それを通して小さな対イオンは通すが、大きな特異的結合物質分子は外側表面上に濃縮される。ここに、それらが第一級アミンの外側層に共有結合し、これが効率的に付着層となる。

浸透層および付着層の形成のための別の技術は、各微細位置チャンバーの塩基に多孔性の膜材料に組み込むことである。次いで、膜の外側表面を化学官能基で誘導化し付着層を形成させる。このアプローチを行うのに適当な技術および材は、

当業者に知られている。

デバイスの設計および作製についての上記記載は、基本デバイスの他の変形または形態を限定することを意味するものでは決してない。より多数または少数のアドレス可能な微細位置を有するデバイスの多くの変形が、異なった分析および分取に適用されると考えられる。より大きなアドレス可能な位置を有するデバイ

スの変形が、分取用生体高分子合成に適用されると考えられる。さらに、微細リソグラフ法により製造されるデバイスを含む他のデバイスに使用する電氣的にアドレス可能で制御可能な試薬分注器として、変形が考えられる。

(2) デバイスの自己指定アドレッシング

本発明のデバイスは、特異的結合物質で各微細位置を電子工学的に自己アドレスすることができる。デバイス自体が、荷電特異的結合物質の特異的微細位置への運搬ならびに付着に直接影響するか、またはそれを引き起こす。デバイスは、ある程度まで外部工程、機構または器具を必要としないで、特異的微細位置で特異的結合物質を物理的に方向付け、位置決定し、または設置する。この自己-アドレッシング工程は、迅速かつ特異的であり、連続様式または並行様式で行うことができる。

デバイスは、DCモードかつ特異的結合物質のものの反対の電荷(電位)に選択した微細位置を維持することによって、特異的結合物質で連続してアドレスすることができる。他のすべての微細位置を特異的結合物質と同じ電荷に維持する。結合物質が結合位置上の付着部位に過剰にない場合には、1個の他の微細位置のみに影響して特異的微細位置まで自由フィールド電気泳動運搬させる必要がある。特異的結合物質は、バルク溶液を通して迅速に運搬され(2~3秒、または好ましくは1秒未満)、それが特殊表面に迅速に共有結合するようになる特異的微細位置において直接濃縮される。特異的微細位置(72)上に結合物質、反応物、または分析物(70)を電子工学的に濃縮する能力を図7に示す。全ての他の微細位置は、特異的結合物質アドレッシング工程の間、保護し、未作用のまま残すことができる。いずれの未反応物質も、特異的微細位置の極性を反対にし、それを

廃棄位置まで電気泳動することによって除去される。全ての所望の微細位置がそれらの特異的結合物質でアドレスされるまで該サイクルを繰り返す。図8は、特異的オリゴヌクレオチド結合物質(82、84、86)で特異的微細位置(81、83、85)をアドレスするための連続工程を示す。

微細位置をアドレスする並行工程には、同一の特異的結合物質を輸送し、濃縮し、1個より多い特異的微細位置と反応するように、多くの(特定の群またはラ

インの) 微細位置を同時に活性化することが含まれる。

(3) デバイスの適用

デバイスが特異的結合物質で自己アドレスされれば、種々の分子生物学型の複数工程かつ複合の反応および分析をデバイス上で行うことができる。本発明のデバイスは、多数の重要な反応指標上の能動的かつ動的な制御を電子工学的に供する。この電子工学的制御によって、制御している反応に新たな物理学的機構が誘導され、反応速度、特異性および感度が顕著に改善される。デバイス能力から発生するこれらのパラメーターにおける改善点は：(1)付着した特異的結合物質を含有する微細位置への反応物または分析物の迅速な輸送；(2)反応物または分析物の濃縮による、特異的微細位置表面上での特異的結合物質との反応速度の上昇；および(3)微細位置からの未反応および非特異的結合成分の迅速かつ選択的な除去である。これらの利点を、「電子工学的な厳格性の制御」と呼ばれる新規方法において用いる。

本発明の自己アドレスされたデバイスは：

- 従来形式のDNAおよびRNAハイブリダイゼーション工程ならびに分析、および新たな改良されたマトリックス形式；
- 分子生物学的反応方法、例えば、制限酵素反応および分析、リガーゼ反応、キナーゼ反応、ならびに増幅方法；
- 大きいまたは小さい抗原およびハプテンを含有する抗原/抗体反応；
- 診断アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーション分析、遺伝子解析、フィンガープリントおよび免疫診断；
- 生体分子結合方法（すなわち、核酸、酵素、蛋白、レポーター基を有する抗体の共有結合的または非共有結合的標識）；
- 生体高分子合成、例えば、オリゴヌクレオチドまたはペプチドの組合せ合成；
- 水溶性合成ポリマーの合成、例えば、炭化水素または直鎖状ポリアクリル酸；および
- 高分子分子およびナノ構造(ナノメートル・サイズの粒子および構造)の合成

と作製

を包含する種々の微細形式化した複数の工程および/または複合の反応ならびに方法（上記に限定されない）を迅速に行うことができる。

核酸ハイブリダイゼーション

核酸ハイブリダイゼーションを本発明の例として用いた。なぜならば、それらは最も困難な多段階反応および多数の反応を特徴づけるからである。

特許請求するデバイスおよび方法によって、従来および新たな種々の様式で核酸ハイブリダイゼーションを行うことができる。反応パラメーターを電子工学的に制御するデバイスの能力は、核酸ハイブリダイゼーション分析、特に、電子工学的な厳格性の制御（ESC）を行うデバイスの能力を改善する。

「核酸ハイブリダイゼーション」なる語は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを包含する全ての天然および合形成態の核酸ならびに核酸誘導体の間の全てのハイブリダイゼーション反応を包含することを意味する。

「ドット・プロット」ハイブリダイゼーションおよび「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションのごとき従来のハイブリゼーション形式は、特許請求するデバイスならびに大スケールのアレイまたはマトリックス形式で行うことができる。

例としては、DNAハイブリダイゼーション分析用のデバイスを設計し、作製し、以下の様式で用いる。微細位置のアレイは、マイクロリソグラフィ技術を用いて最初に製作される。アレイ上のアドレス可能な微細位置の数は、最終的な用途に依存する。該デバイスは、特異的オリゴヌクレオチド群と連続様式で迅速

に自己アドレスする。この場合、特異的オリゴヌクレオチドは、6量体～100量体の範囲の3'-末端アルデヒド官能化オリゴヌクレオチドであるが、所望により、さらに長いポリヌクレオチドを付着することができる。アルデヒド官能基は、特異的微細位置付着表面に共有結合させることができる（図4参照）。この群の特異的オリゴヌクレオチドは、従来技術を用いた従来のDNAシンセサイザー上で容易に合成することができる。

各特異的オリゴヌクレオチドの合成は、リボヌクレオチド制御された孔ガラス

(CPG)支持体から開始する。かくして、3'-末端位置にはリボヌクレオチドが含有され、次いでこれは末端ジアルデヒド誘導体へ合成され、精製された後に過ヨウ素酸酸化によって容易に転化される。オリゴヌクレオチド(40)を含有するアルデヒドは、シフ(Schiff)塩基反応工程によって、微細位置表面上の第一級アミン官能基と容易に反応するであろう。

特異的オリゴヌクレオチドとデバイスとの電子工学的アドレッシングを図8に示す。第1の特異的微細位置(ML-1)(81)とその特異的配列オリゴヌクレオチド(SSO-1)(82)とのアドレッシングは、特異的微小電極(ML-1)を正のDC電位に維持する一方で、全ての他の微小電極を負の電位に維持することにより達成する(図8(A))。水性緩衝液中のアルデヒド官能基化特異的配列(SSO-1)は、ML-1アドレスまで自由フィールド電気泳動され、そこでそれを濃縮($>10^6$ 倍)すると直ちにML-1(81)の表面に共有結合する。全ての他の微細電極は負に維持されており、SSO-1配列(82)との反応から依然として保護または遮断されている。次いで、ML-1電位を負(-)に逆転させていずれの非処理SSO-1も廃棄系まで電気泳動する。サイクルは、全ての所望の微細位置がそれらの特異的DNA配列でアドレスされるまで、SSO-2(84)→ML-2(83)、SSO-3(86)→ML-3(85)、SSO-n→ML-nを繰り返す(図8(D))。

デバイスをアドレスするもう1つの方法は、電子工学的試薬供給デバイスから特異的オリゴヌクレオチドのごとき特異的結合物質を輸送することである。この供給デバイスは大量の結合物質または試薬を保持し、分析的デバイスを負荷する

のに用いられるであろう。結合物質は、2つのデバイス間で電子工学的に輸送されるであろう。かかる方法により、マイクロビペット添加、およびデバイス内またはデバイス間の複雑な流体デリバリー系のごとき物理的操作の必要がなくなった。

デバイスをアドレスするさらにもう1つの方法は、特異的微細位置で特異的オリゴヌクレオチドの組合せ合成を行うことである。組合せ合成は後のセクションで記載する。

特異的DNA配列でデバイスをアドレスした後も、アレイデバイス上の微細位置の下側の微細電極が独立作動性直流(DC)電極のままである。下部微細電極は化学的または物理学的に絶縁されないように電極表面へ付着させるため、このことは可能である。各微細電極は、微細位置表面へのおよびそこからの他の荷電DNA分子の自由フィールド電気泳動輸送に必要な強い直流を各微細電極は依然として作り出すことができる。かくして、DNAアレイ・デバイスは、DNAハイブリダイゼーションの全ての態様およびいずれの他の続く反応にわたり完全に電子制御する。

電子工学的に制御されたハイブリダイゼーション工程の一例を図9に示す。この場合において、各アドレス可能な微細位置は特異的捕捉配列(90)を有する。標的DNA(92)を含有する試料溶液を該デバイスに付する。全ての微細位置が活性化され、該微細位置で試料DNAが濃縮される(図9(B))。希釈溶液からの標的DNA分子が微細位置に高濃度に濃縮されるようになったことにより、表面上の特異的相補DNA配列に非常に迅速にハイブリダイゼーションさせることができる。微細電極電位をが逆転させると、全ての非-ハイブリダイゼーションDNAは微細位置から反発するが、標的DNAはハイブリダイズしたままである(図9(C))。同様な様式において、続く工程でレポーター・プローブをハイブリダイズさせて、ハイブリダイズした複合体を検出する。

ハイブリダイゼーション工程の電子工学的制御は、全体のハイブリダイゼーション効率を向上し、かつ微細位置領域から非-特異的DNAを除去することによって、引き続き行われる標的DNA分子の検出を改善する。非-増幅ゲノムDNA

において10,000~100,000コピーの標的配列が検出できると予想される。この型のハイブリダイゼーション反応は、最小限の外部操作で数分またはそれ未満で行うことができる。さらなる洗浄は必要ない。

もう1つのDNAハイブリダイゼーションアッセイの通常の形式には、表面上に固定化した標的DNAを有すること、および次いで特異的プローブをこれらの標的DNAにハイブリダイズさせることが含まれる。この形式には、複数位置の

同一の標的DNA、または特異的位置の異なる標的DNAのいずれかを含むことができる。図10は、この連続ハイブリダイゼーション形式の改善バージョンを示している。この場合において、微細位置(101-107)は異なる捕捉DNAでアドレスされる。これらは、オリゴヌクレオチドに特異的な異なる配列と連続様式でハイブリダイズする(108、109)。微細位置は、順次、正に偏倚させて、分子をそれ自体に輸送し、次いで、負に偏倚させて該分子を次の微細位置に輸送する。電位に関係なく、特異的にハイブリダイズしたDNAは微細位置に残るであろう。配列特異的オリゴヌクレオチドは、蛍光発色団のごとき適当なレポーター基で標識することができる。

特許請求するデバイスは、電子工学的な厳格条件を供することができる。厳格性の制御は、ハイブリダイゼーション特異性に必要であり、点突然変異における一塩基誤対合の解読には特に重要である。図11は、電子工学的な厳格性の制御を一塩基誤対合分析にいかにか用いることができるかを示している。電子工学的な厳格性の制御は、複数-塩基-誤対合の分析にも適用することができる。

完全対合DNAハイブリッド(110)は、誤対合DNAハイブリッド(112)よりも僅かに安定である。微細位置を負に偏倚させ(図11(B))、所定量の電気泳動電力を所定時間流すことによって、この誤対合DNAハイブリッドを変性または除去しつつ、完全対合DNAハイブリッドを保持することが可能である(図11(C))。さらなる改善において、特許請求するデバイスは、該デバイス上で生じる各特異的ハイブリダイゼーション反応に個別の厳格性の制御を提供する。従来のまたは受動アレイ形式では、同一ハイブリダイゼーション溶液中に生じる全てのハイブリダイゼーション事象について最適な厳格性を達成することは不可

能である。しかしながら、本発明の能動的アレイ・デバイスは、それらが同一のバルクハイブリダイゼーション溶液中で生じる場合でさえ、異なる微細位置におけるハイブリダイゼーションに異なる電子工学的厳格性を供することができる。このことは、従来のマトリックスまたはアレイ・ハイブリダイゼーション形式、ハイブリダイゼーション形式による配列決定(SBH)、および他の複合分析の生来の大きな限界を克服するのに貢献する。

電子工学的な厳格性の制御をハイブリダイゼーションに提供する能力は、レポーター基標識DNAプローブを用いることなくDNAハイブリダイゼーションを検出する新たな機構も提供する。それは、ハイブリダイゼーション工程自体をさらに直接的に検出する方法を提供する。蛍光色素検出工程を図12に示し、実施例4および6に記載する。DNAハイブリッドの直接検出は、臭化エチジウムのごときDNA結合色素を用いることによって達成できる。該色素は二本鎖および一本鎖DNAの双方に結合するが、前者により大きな親和性を有する。図12(B)において、正に電荷した色素(122)は、負に偏倚した微細位置に輸送される。該色素は、ハイブリダイズした(120)および非-ハイブリダイズ(121)のDNA配列の双方に結合する(図12(C))。微細位置を正に偏倚し、所定量の電力を所定時間流すことによって、該色素分子が非-ハイブリダイズ微細位置に結合して選択的に除去される。供給される電力量はDNAハイブリッドに有害に作用しないものである。

次いで、色素分子と結合したハイブリダイズDNAを、組み合わされた、あるいは一体化された光学システムを用いて蛍光検出する。

本発明のデバイスは、以下の反復する重要な利点を核酸ハイブリダイゼーション反応および分析に提供する：

(1)希釈された標的DNAおよび/またはプローブDNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的微細位置(群)への迅速な輸送。この工程は、長くとも2〜3秒で行われる。

(2)希釈された標的DNAおよび/またはプローブDNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的微細位置(群)での濃縮。濃縮効果は、ゆうに百万倍

($>10^6$)を超えうる。

(3)非-特異的結合標的DNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的微細位置(群)からの迅速な除去。この工程は10ないし20秒かかる。

(4)競合する相補的標的DNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的微細位置(群)からの迅速な除去。この工程は10ないし20秒かかる。

(6)数分のうちに完全なハイブリダイゼーション工程を行う能力。

(7)最小限の外部操作または洗浄工程でハイブリダイゼーション工程を行う能力。

(8)部分ハイブリダイズDNA配列を除去するための電子工学的な厳格性の制御(ESC)の使用。

(9)1,000～100,000コピー範囲の非増幅ゲノム標的DNA配列のハイブリダイゼーション分析を行うことができる能力。

(10)単一塩基誤対合ハイブリダイゼーション(点突然変異)の分析を改良するためのESCの使用。

(11)マトリックス・ハイブリダイゼーションに個々の厳格性の制御を提供するためのESCの使用。

(12)非-特異的バックグラウンド成分を除去することによるハイブリダイゼーション事象の検出を改善すること。

(13)ハイブリダイゼーションを検出するために共有結合的に標識したレポータープローブまたは標的DNAを用いる必要性がない新たな方法の開発。

デバイスの再生産

特異的結合物質で個々のデバイスを別々にアドレッシングすることに加えて、特異的結合物質を他のデバイスにコピーできるマスターデバイスを作製することも可能である。このことは、デバイスの作製または製造のもう1つの方法を表している。デバイス複製の工程を図13に示す。特異的結合配列でアドレスされた微細位置を含むマスターデバイスを、各々の相補的DNA配列(130)とハイブリダイズさせる。これらの相補的配列は活性化され、それ故、微細位置付着層に共有結合できる。

付着層を含有する非アドレス姉妹デバイス(132)を、ハイブリダイズしたマスターデバイスにそろえる(図13(B))。マスターデバイスの微細位置は負に偏倚しており、姉妹デバイスの微細位置は正に偏倚している。DNAハイブリッドを変性させられ、活性化DNA配列が微細位置に共有結合する姉妹デバイスまで輸送される(図13(C))。微細位置間のクロストークが最小限化されるように、デバイス構造によっては、該工程を平行または連続で行うことができる。ハイ

ブリッドを、十分な負電位を適用することによって、または正に電荷したカオトロピック剤または変性剤を用いることによって変性させることができる。

検出システム

蛍光結合反応の場合、結合反応を分析するためにエピ蛍光型の顕微鏡検出システムを使用することができる。該システムの感度は、組み合わせたイメージング検出器エレメント（CCD、ICCD、マイクロチャネル・プレート）、またはフォトン計数PMTシステムに依存する。1の別法は、高感度CCDチップ検出器またはアバランシェ・フォトダイオード(APD)検出器をデバイスにサンドイッチ配置として直接的に組み合わせることである。さらなる別法は、デバイス中に光電子的検出器または微小電子的検出器を組み込むことである。

組み合わせ生体高分子合成

本発明のデバイスは、オリゴヌクレオチドおよびペプチドのごとき生体高分子の組合せ合成を行うこともできる。かかる工程によって、外部の検出または影響を全く必要としないで自己指定の合成を行うことができる。本発明の組合せ合成によって、非常に多数の配列をデバイス上で合成することができる。組合せ合成の基本概念には、輸送し、デリバリーし、濃縮し、モノマーを反応させ、試薬をカップリングし、またはアドレス可能な微細-位置で試薬を脱ブロッキングするためのデバイスの使用が含まれる。該概念はデバイスの能力を利用して、近隣の試薬および反応物の作用から特定の位置を保護する。1またはそれを超える反応

物が正味正または負に荷電するか、またはこれらの工程に適したかかる試薬を作り出すかのいずれかであるこれらの化学合成プロセスにおける選択工程の同定も該概念に重要である。

組合せオリゴヌクレオチド合成の1つの方法を図14に示す。この方法は、1セットの選択的にアドレス可能な微細位置(140)で開始し、該微細位置の表面はブロックされた第一級アミン(X-NH-)基(142)で誘導化されている。該工程における最初の工程には、電荷脱ブロッキング試薬(144)を用いた微細位置の選択的脱ブロッキングが含まれる。この場合において、該試薬は正(+)電荷に帯電しているであろう。該工程は、脱-ブロックしたそれら微細位置に負電位を

適用し、正電位を保護されたままの微細位置に適用することによって行う(図14(B))。正および負電位を選択電極に適用することによって、荷電試薬を脱-ブロックすべき微細位置に濃縮し、他の微細位置からの試薬を排除する。

第二工程において、システムをホスホラミダイト試薬(x-C)(146)に単に暴露することによって、最初の塩基、この場合にはシトシンの脱ブロック微細位置への化学カップリングが行われる。(C)ヌクレオチドは脱-ブロックされた微細位置表面にはカップリングするが、ブロックされた電極表面には全くカップリングしない(図14(C)および(D))。この時点で通常のホスホラミド化学が次の脱-ブロッキング工程まで行われる。

第二脱ブロッキング工程で(図14(D))、次の塩基とカップリングすべき電極位置を負とし、保護したままの位置を正とする。今度は、カップリングすべき次の塩基に該システムを暴露し、この場合(x-A)(148)において、脱-ブロッキングした微細位置への選択的なカップリングが達成される(図14(E)および(F))。カップリングおよび脱-ブロッキング法は、異なるDNA配列の全部が各アドレス可能な微細位置表面上で合成されるまで繰り返される。

前記の例は、核酸合成の1つの可能なアプローチを表している。もう1つのアプローチには、完全水溶性DNA合成が含まれる。この場合において、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCA)のごとき荷電した水溶性カップリング剤を用いて、水溶性核酸誘導体と共にオリゴヌクレオチド

合成を行う。このアプローチは、塩基の広範なブロッキングを要する現在の有機溶媒に基づく技術を上回る重要な利点を有するであろう。水溶性合成は、より安価で、かつ現在の有機溶媒に基づく工程で用いる多くの有害な物質の使用がなくなるであろう。第三のアプローチには荷電モノマーおよび酵素の使用が包含される。

DNA合成に加えて、同様な方法をRNA合成、ペプチド合成、および他の複合ポリマーのために開発することができる。この開示において企図された例は、この方法のための初期の可能性を提示するものであり、DNAまたはペプチドの合成のための有機溶媒をベースとした合成方法に基づく。

以下の実施例中の緩衝液、溶液および媒体の処方、ジェイ・サムブルック(J. Sambrook)、イー・エフ・フリッシュ(E. F. Fritsch)、およびティー・マニアティス(T. Maniatis)「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)のコールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)社、1989年に記載されている。

実施例1：オリゴマー試薬

合成DNAプローブを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)の自動DNAシンセサイザーによって通常のホスホアミダイト化学を用いて作製した。オリゴマーは5' アミノまたは3' リボヌクレオシド末端のいずれかを含むように設計された。5' の官能基を、ABI アミノリンク 2 試薬を用いることによって包含し、3' の官能基はRNA CPG 支持体から合成を開始することにより誘導した。3' リボヌクレオチド末端は過ヨウ素酸酸化法により末端のジアルデヒドに変換することが出来、これは第一アミンと反応してシッフ塩基を形成し得る。反応条件は以下の通りであった：100 μ l の終濃度となるように水に20-30 O. D. のオリゴマーを溶解する。1容の0.1 M酢酸ナトリウム、pH 5.2 および1容の0.45 M 過ヨウ素酸ナトリウムを添

加する(水中で新たに調製する)。反応を暗中室温にて少なくとも2時間攪拌しインキュベートする。反応混合物を、0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.4 中で平衡化したSephadex G-10 カラム(パスツールピペット、0.6 \times 5.5 cm)の上にのせる。200 μ l の画分を集め、薄層クロマトグラフィー(TLC)上に2 μ l 分をスポットし、紫外線(UV)吸収画分をためる。

以下のオリゴマーは3' リボヌクレオシド末端(U)を含む：

ET12R	5' - GCT AGC CCC TGC TCA TGA GTC TCU
CP-1	5' - AAA AAA AAA AAA AAA AAU
AT-A1	5' - CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U
AT-A2	5' - GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU
AT-A3	5' - CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU
AT-A4	5' - GTC TCC TTC CTC TCC AGU
AT-A5	5' - GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU
AT-A6	5' - CTG GAG AAG AAG GAG ACU
AT-A7	5' - TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U
AT-A8	5' - TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU
AT-A9	5' - TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU
AT-A10	5' - CAT CGC TGT GAC AAA ACA TU

5' アミン基を含むオリゴマーは一般的にテキサスレッド (TR, 励起 590 nm, 発光 610 nm) のごとき発蛍光団と反応する。安定なスルホンアミド結合を形成する第一アミンに対し塩化スルホニルは非常に反応性がある。テキサスレッド-DNA複合体は以下のごとく作製された: テキサスレッド塩化スルホニル (分子プローブ) を終濃度が 50 mg/ml になるようジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した。オリゴマーを終濃度 10. D. / μ l (21-マーに対して 5.4 mM) となるように 0.4 M 炭酸水素ナトリウムに溶解した。微量試験官中で、10 μ l オリゴマーと 20 μ l テキサスレッドを合わせた。反応を 1 時間暗中進行させる。反応をアンモニアまたはヒドロキシルアミンで冷却し、試料を凍結乾燥し、PAGE で精製する (サンプルック (Sambrook) ら、1989、上記)。

以下のオリゴマーが 5' アミノ末端を含む:

ET21A	5'- アミノリンク 2 -	TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT
ET10AL	5'- アミノリンク 2 -	GAG AGA CTC ATG AGC AGG
ET11AL	5'- アミノリンク 2 -	CCT GCT CAT GAG TCT CTC
T2	5'- アミノリンク 2 -	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT
RC-A1	5'- アミノリンク 2 -	CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG
TCC ACG TAG		
RC-A2	5'- アミノリンク 2 -	CTC CAA ATT TGC TGA ACT C
RC-A3	5'- アミノリンク 2 -	GGA GAT GAG GAG TTC TAC G
RC-A4	5'- アミノリンク 2 -	CTG GAG AGG AAG GAG AC
RC-A5	5'- アミノリンク 2 -	CCA CGT AGA ACT GCT CAT C
RC-A6	5'- アミノリンク 2 -	GTC TCC TTC TTC TCC AG
RC-A7	5'- アミノリンク 2 -	GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA
RC-A8	5'- アミノリンク 2 -	ATC TTC TAA ATC TGC GGA A
RC-A9	5'- アミノリンク 2 -	GTC TGA GAA CAG GCA AAC A
RC-A10	5'- アミノリンク 2 -	ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

実施例 2 : 微細加工デバイス上の電氣的にアドレス可能な微細位置—ポリリジン法

マイクロキャピラリーチューブ (0.2 mm×5 mm) から微小電極を製造した。マイクロキャピラリーを0.1—1.0%のポリリジンを含む18—26%のポリアクリルアミドで満たし、多量体化させた。過剰のキャピラリーを計測し、チューブ内に気泡がトラップされるのを防ぎ、チューブ長を標準化するため除去した。キャピラリーを、共通の上部バッファー槽を共有しそれぞれ下部のバッファー槽を持つような方法で乗せた。それぞれの下部のバッファー槽は白金線電極を含んでいた。

上部槽のマイクロキャピラリーの頂部表面をアドレス可能な微細位置になるよう考慮した。上部および下部槽を0.1M リン酸ナトリウム、pH 7.4で満たし、バイオラッドの500/1000パワーサプライ(Bio Rad 500/1000 power supply)を用いて0.05mAの定電流で10分プレランした。パワーがオンの間2μl (0.10. D.) の過ヨウ素酸酸化したET12Rを上部槽にピペットで入れ、定電流にて2—5分間電気泳動する。今や試験キャピラリーが負に偏

るように極性を逆にしさらに2—5分間電気泳動する。結合しないDNAは反発し一方共有結合したDNAは残存する。

上部槽バッファーを吸引しバッファーですすぐ。装置を分解し新しい対照キャピラリーを乗せる。槽を再び満たし蛍光ラベル相補的DNA、すなわちET10AL-TRを添加する。0.05mAの定電流にて2-5分正に偏った試験の微小配置においてオリゴマーを電気泳動的に濃縮する。極性を逆とし結合しないコンプリメント(complement)を除去する。試験キャピラリーを除去し、蛍光により実験する。相補的でないDNA配列 ET21A-TRをET10AL-TRに置換し、非特異的結合に対する負の対照を上記記載の如く行った。

キャピラリー微細位置のクロスセクションを、ハママツ・アイシーシーディ・カメラ・イメージング・システム(Hamamatsu ICCD camera imaging system)に適合したイエーナ・エピフルオレセント・マイクロスコープ(Jena epifluorescent microscope)下で試験した。蛍光の結果により、コンプリメント ET10AL-TRが結合本体/補足配列にハイブリダイズし、ポテンシャルが負に変化した場合にもハイブリダイズしたままであったことを示す。ET21A-TRのノンコンプリメントは、ポテンシャルが逆になった場合には保持されなかった。

実施例3：微細加工デバイス上の電氣的にアドレス可能な微細位置—スクシニミジルアクリレート法

この実施例はオリゴマーの5'末端に共有的に結合する他の付着化学を記載する。1% スクシニミジルアクリレート(分子プローブ)をポリリジンの代わりに用いる以外は上記記載のごとくキャピラリーを製造した。キャピラリーを新たに作成した、なぜならスクシミジルエステルは第一アミンと反応し、特にpH8.0以上では不安定だからである。キャピラリーを上記記載のごとく乗せ、槽を0.1M リン酸ナトリウム、pH7.4で満たした。キャピラリーを0.05mAで10分プレランする。パワーがオンの間2 μ l(0.1O.D.)のET10ALを上部槽にピペットで入れ、2-5分間電気泳動する。今や試験キャピラリー

が負に偏るように極性を逆にしさらに2-5分間電気泳動する。結合しないDNAは反発し一方共有結合したDNAは残存する。

上部槽バッファーを吸引しバッファーでリンスする。対照のキャピラリーを外

して新しい対照キャピラリーを乗せる。槽を再び満たし蛍光ラベル相補的オリゴマー、ET11AL-TRを添加し、上記記載のごとく電気泳動する。ノンコンプリメント(noncomplement)なDNA配列ET21A-TRをET11AL-TRに置換し、非特異的結合に対する負の対照を上記記載の如く行った。

蛍光の結果により、コンプリメント ET11AL-TRが補足配列にハイブリダイズし、ポテンシャルが負に変化した場合にもハイブリダイズしたままであったことを示す。ET21A-TRのノンコンプリメントは、ポテンシャルが逆になった場合には作動しているキャピラリーにおいては保持されなかった。

実施例4：電氣的に制御した蛍光染料検出プロセス-PAGE

臭化エチジウム(EB)のごときDNA染料はDNAに挿入した場合に蛍光性となる。蛍光および結合アフィニティーはDNAが一本鎖である場合よりも二本鎖である場合の方が大きい。実施例1のごとくキャピラリーを調製し、上記記載のごとくハイブリダイズする。EBを溶液に添加し(～0.05mMのEB終濃度)、試験キャピラリーを負に偏らせる、なぜならEBは正の電荷をおびているからである。キャピラリーを、550nmの励起および600+nmの発光におけるエピフルオレセンスによって観察した。ハイブリダイズしたおよびハイブリダイズしない微細位置が赤い蛍光を示した(EBから)。

キャピラリーをEBを反発するため正に偏らせて再びのせた。0.03ボルト一時間に対して定電流を0.05mAに維持する。

捕獲	標的	標準化したシグナル
ET10AL	ET11AL (正)	>200
ET10AL	ET21A (負)	1

ハイブリダイズしない微細位置での蛍光は減少する一方で、ハイブリダイズしたキャピラリーは蛍光を維持した。蛍光性シグナルをICCDカメライメージン

グシステムを用いて測定し、ピークの蛍光性強度を表す。もし全体の蛍光シグナル領域を積分すれば、ノイズ率へのシグナルは>>1000倍であろう、これはノイズ率への増大するシグナルのための方法および分析の動的範囲を示す。

実施例5：金属基質上の電氣的にアドレス可能な位置

アルミニウム (A1) および金 (Au) 線 (0.25 mm, アルドリッチ (Aldrich)) をトルエン中 10% 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APS) と反応させた。APS 試薬は金属表面上で該オキシドおよび／またはヒドロキシル基と容易に反応し、オキシドおよび／またはヒドロキシル基および第一アミン基間の共有結合を形成する。アルミニウムに対する前処理は必要でなかった。金線を 5×SSC 溶液での電気分解に付し、酸素層を形成した。代わりに、金属線を過塩素酸浴内で酸化することも出来る。

APS 反応を以下のように行った：線を 3 インチに切断し、ガラスの皿に置く。完全に線を覆うためにトルエンを添加し、加熱したプレート上温度を 50–60℃ とした。APS を終濃度 10% となるよう添加した。溶液を混合し、反応を 30 分間続行させる。大量のトルエンで 3 回すすぎ、次いで大量のアルコールですすいで 50℃ のオープン中で乾燥する。APS 処理した線を次いでアルデヒドと反応させシッフ塩基を形成することが出来る。他で記載したごとく、結合本体 ET12R を過ヨウ素酸酸化した。電極を脱気水の槽中に置いた。パワーを約 30 秒間、0.5 mA の定電流で適用した。活性化された ET12R を直ちに添加した。パワーを適用し、液体を吸引し、新しい水を添加し、次いで再び吸引した。試験 (正に偏った) および対照電極を、蛍光性ラベルしたコンプリメント DNA、ET10-TR を含むハイブリダイゼーションバッファー (HB, 5×SSC, 0.1% SDS) 中に置いた。2 分後電極を 3 回、それぞれ 1 分間ウォッシュバッファー (1×SSC, 0.1% SDS) で洗浄し、蛍光により観察した (励起 590 nm, 発光 610 nm)。

結果は ET12R が処理した金属表面に特異的に結合したことを示す。試験電極は蛍光性である一方で対照電極はそうではなかった。金属への DNA の非特異

的吸着がハイブリダイゼーションバッファー中の SDS の存在によって妨げられた。電気分解による金基質の付着および引き続く APS 処理が効果的であった。得られたシグナルが、酸化されない金について観察されたものよりも顕著に強かった。より重要なことには、この実施例は、金属表面に結合本体によって化学的

に機能を与え、被覆することが可能であるであろうが、溶液から絶縁できないことを示した。A P S 法はDNA-金属複合体を形成するための多くの使用可能な化学の1つを示す。

実施例6：電氣的に制御された蛍光染料検出法—金属線

実施例5に記載されるごとくDNA-アルミニウム電極基板を調製し、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズした、またハイブリダイズしないDNA-A1線電極を、対照としての被覆しないA1線と共に処理した。EBを溶液に添加し、試験DNA電極を、染料を引き付けるように負に偏らせた。容器を吸引し、新しいバッファを添加した。金属表面を顕微鏡下試験した。

装置を再び乗せ、決定したボルト—時間に対し正のポテンシャルを適用する。該バッファを吸引し、電極をエピフルオレセンスにより観察した。ハイブリダイズしたまたはハイブリダイズしない金属表面間の蛍光性の顕著な相違が見られるまでこれを繰り返した。

捕捉	標的	標準化したシグナル
ET12R	ET10AL (正)	>140
ET12R	無 (負)	1

ハイブリダイズしない金属表面での蛍光は減少する一方で、ハイブリダイズした金属表面は蛍光を維持した。蛍光性シグナルをICCDカメライメージングシステムを用いて測定し、ピークの蛍光性強度を表す。もし全体の蛍光シグナル領域を積分すれば、ノイズ率へのシグナルは>>1000倍であろう。この実施例はノイズ率への増大するシグナルのための方法および分析の動的範囲を示す。キャピラリーゲルコンフィグレーションを用いて類似の結果が得られたので、このことは電気化学的影響が分析の実行に顕著には影響しないことを示す。

実施例7：活性なプログラム可能な電氣的マトリックス (A P E X) —微小—機械製造

6のアドレス可能な250 μ mのキャピラリー—配置のラジカルな列を微小—機械とした。該装置はそれぞれの微細位置におけるポテンシャルが個別にアドレ

ス可能であるような共通の上部槽および別々の下部槽を持つ。唯一のオリゴマー結合本体が他で記載された方法によって具体的なキャピラリー微細位置に存在し、結合する。試験微細位置は正のポテンシャルを持つ一方で他方の微細位置は非特異的相互作用を防ぐため負のポテンシャルを持つ。

列を洗浄し、次いで相補的蛍光ラベルDNAプローブとハイブリダイズさせた。過剰のプローブを除去するために列を洗浄し、エピフルオレセント顕微鏡下で観察する。具体的にアドレスした微細位置のみが蛍光性となるであろう。この過程は他の配置での他の結合本体について繰り返され、他の蛍光性部分でラベルしたプローブとハイブリダイズすることによって変化するであろう。

DNA配列は他の配置との無視してよい混線を伴い前もって決定した位置に配置される。このことにより、前もって決定した場所での数個から数百個までの唯一の配列でのマイクロマトリックスの製造が可能となる。

実施例8：活性な、プログラム可能な電氣的マトリックス（APEX）ーマイクロリソグラフィー製造

シリコンウエハー上の50 μm の四角のアルミニウム電極の8×8マトリックス（図3参照）を設計し、製造し、スイッチボックスと包装した（詳細は装置製造の節を参照）。いくつかの物質および過程の進展が、以下に記載されるように、チップの選択性および効果を増大するためなされた。

8 a) トップコートを選択

APSの過程はチップ全体を包含する。機能化過程における選択性はチップ表面の反応性に依存した。微細位置を囲む領域の機能化および引き続くDNAの付着を減少させるため、SiO₂または金属酸化物よりも、APSに対しより反応

性がない物質が必要である。光レジストおよび窒化ケイ素を試した。異なるトップコートを二酸化ケイ素のチップに適用した。チップをエピフルオレセンスによって試験し、次いでAPSで処理し、続いて過ヨウ素酸酸化したポリA RNA配列（シグマ(Sigma)，分子量100,000）の共有的付着が起こった。チップを、37℃にて5分間、ハイブリダイゼーションバッファー中で、テキサスレッドの200 nMの溶液でラベルした20マー（T2-TR）とハイブリダイズさ

せた。チップをWB中で3回洗浄し、 $1 \times \text{SSC}$ 中で1回洗浄した。チップは590 nmの励起および610 nmの発光での蛍光により試験した。

二酸化ケイ素が選択された、なぜならこれは二酸化ケイ素と比較してAPSに対し反応性が非常に少なく、光レジスト試験されたように本質的に蛍光ではない。背景領域のUV焼損のごとき他の方法も可能である。

8 b) APEX 物理的評価

完成したマトリックスチップを、B & L顕微鏡およびCCDカメラに適合したプローブ・テスト・ステーション(Probe Test Station) (マイクロマニピュレーター モデル 6000) を用いて視覚的に試験した。チップを、試験パッドと外部接触パッド間の連続性について試験した。これは、パッドを、マルチメーターに接続したマニピュレーターのプローブチップと接触させることにより行った。連続性によって、パッドが金属表面に刻み付けられることが確実となった。パッドを次いで電気分解環境における安定性について検討した。金属線は、通常の乾燥条件で1 mAまで制御されるとみなした。しかしながら、湿った環境での反応は未知であった。緩衝化された溶液($1 \times \text{SSC}$)の一滴($1-5 \mu\text{l}$)を 8×8 マトリックス上にピペットで乗せた。表面張力によって、液体をその場に止め、外部接触パッド領域を乾燥した状態とする。プローブチップを接触パッドに接触させ、他のプローブチップを液体と接触させた。電流を、HP 6625A パワーサプライおよびHP 3458A デジタルマルチメーターを用い、最高電圧50 Vにおいて50 nAまで増大させた。

最初の製造はシリコン基質、二酸化ケイ素絶縁層、アルミニウム析出、パターニング、および、窒化ケイ素トップコートからなる。これらのチップは湿った環境ではあまり安定ではない、なぜなら金属/窒化物界面はもともと物理的であって、電気分解は窒化物の層を傷付けるであろうからである。これは、パッドが電氣的にショートするという結果になるであろう。さらに窒化ケイ素およびAlは異なる膨張率を有するため窒化物の層に電流が適用されたときひびが入るであろう。このことにより、溶液が金属に直接接触することになり、再び電気分解という結果となり、これはさらに層を傷つけるであろう。

第二の製造過程はアルミニウム金属および窒化ケイ素層間の二酸化ケイ素絶縁層を含む。二酸化ケイ素およびA1はより適合する物理的性質をもち、より安定で頑丈に作られたチップを提供するためにより良い化学的界面を形成する。

8 c) DNA付着

実施例5に記載されるごとく、マトリックスチップをAPS試薬と共に機能化した。チップを次いで過ヨウ素酸酸化したポリA RNA (シグマ(Sigma)、平均分子量100,000)で処理した。過剰なRNAおよび結合していないRNAを除去するためチップをWB中で洗浄した。この過程により、捕捉配列を伴うチップ全体を、窒化物で被覆した領域におけるよりも暴露された金属表面において高密度で被覆した。チップを37℃にて5分間HB中T2-TRの200nmの溶液とハイブリダイズさせた。次いでWB中で3回、1×SSC中で1回、室温にてそれぞれ1分間洗浄した。チップを、590nmの励起および610nmの発光での蛍光により試験した。開かれた金属の領域は明るく蛍光性であり、パッドの形を持っていた。低い蛍光性強度および／または不規則な境界線は、パッドが完全には開いていないことを意味するであろう。付加的なプラズマエッチ時間は推奨されるであろう。

8 d) 電氣的に制御されたハイブリダイゼーション

活性ハイブリダイゼーションは実施例8cからのチップを用い、1の微細位置を正に偏らせることにより行った。これは、残存する微細位置を自動的に負に偏らせるであろうスイッチボックスを用いるか、または外部溶液電極を用いることによってなされた。3マイクロリットルの水をマトリックスのパッド上に堆積させた。～1-5nAの電流を数秒間適用し、0.1pmoleのT2-TRを溶

液に添加した。液体を除去し、チップを乾燥し、テキサスレッド波長(励起590nm, 発光610nm)における蛍光として試験した。

正に偏った微細位置のみが蛍光性であった。これは、他の微細位置を選択的にハイブリダイズするため何回も繰り返すことができる。付加的には、1の微細位置での蛍光性DNAは、最初の配置を負に偏らせ、目的地を正に偏らせることによってもう一個の微細位置に移すことができる。

8 e) 電氣的に制御されたアドレッシングおよび装置製造

マトリックスを上記記載のごとくAPSで機能化した。結合本体CP-1は過ヨウ素酸酸化法によって活性化した。4の微細位置をマトリックス中正に偏らせ、残りを負に偏らせた。2マイクロリットルの水をマトリックス上に堆積させ、電流を適用した。結合本体CP-1を添加し、指示した配置において濃縮させた。液体を除去し、チップを手短かに水でリンスし、2マイクロリットルの水をチップ上に堆積させた。再び、電流を数秒間適用し、 0.1 pmole のT2-TTRを添加した。液体を短時間たった後に除去しチップ全体を3回WB中で洗浄した。チップを乾燥させ、蛍光を試験した。

結果は、正に偏った微細位置が蛍光性であることを示す。この実施例は、特異的結合本体についての微細位置の選択的アドレッシング、配置および微細位置への配列の共有結合、被覆した微細位置への相補的標的配列の特異的なハイブリダイゼーションを示す。

8 f) ゼネティック・タイピング・エイピーイーエックス・チップ (Genetic Typing APEX Chip)

3' リボヌクレオシド末端のDNA結合本体が合成され、これはHLA遺伝子dQaのポリモルフィズム (polymorphism) に特異的である。結合本体は上記記載のごとく過ヨウ素酸酸化により活性化される。逆のコンプリメントは5' アミノ末端からも合成し、他で記載したテキサスレッド、ローダミンおよびボディピイ色素のごとき発蛍光団と複合させる。微細位置は他で記載したごとくAPSでの処理によって第一アミンで機能化する。一組の1マイクロリットルの溶液をマトリックス上に置き、接触パッドは乾いたままとする。具体的な微細位置は、そ

の微細位置を正に偏らせることによってアドレスし、過ヨウ素酸酸化したDNAオリゴマーを、 $\sim 0.1 \text{ pmole}$ 添加し、その配置に移し、共有結合させた。極性を逆とし、非結合結合本体分子を除去する。これは、全ての唯一の結合本体がチップに結合するまで、他のアドレスされた微細位置の他の結合本体について繰り返される。チップを次いで、全てのアドレスされた微細位置を同時に視覚化するためと同様ひとまとめに、結合反応の特異性を決定するためのそれぞれの蛍

光的にラベルしたコンプリメント配列にハイブリダイズさせる。相補的オリゴマーを除去するために変性した（0.05% SDS中90℃にて10分間）同じチップ上で、アドレスした微細位置を、ゲノムDNAのラベルしない逆のコンプリメントとハイブリダイズする。検出は、他で記載したごとく蛍光性染料検出分析によって行われる。

結果は、微細位置が唯一の結合本体で特異的にアドレスされることを示すであろう。負に偏った微細位置への非特異的結合は無視できるであろう。装置および関連する結合本体化学は変性条件下で安定であり、したがって、アドレスされ製造された装置を再利用可能とする。ハイブリッドを変性する代わりに方法は、電流を増加し、および／またはそれが適用される時間を増加することであろう。

実施例9：電氣的強度対照

電氣的強度対照に影響する装置の能力は、ラス・オンコジーン・モデル・システム(Ras on cogene model system)について示される。1の塩基対の誤対合は不都合にも融点(T_m)、すなわち二重らせんの安定性の測定値に影響する。誤対合と完全な対合(すなわち厳格性対照)を区別する伝統的な方法は、温度および塩条件に依存する。厳格性は電気泳動的ポテンシャルによっても影響され得る。以下にリストしたオリゴマーは、得られたハイブリッドが0-2の誤対合を持つように対合させることができる。オリゴマー結合本体は微細位置に結合し、他で記載したごとくハイブリダイズする。微細位置での極性は次いで逆にされ、ハイブリッドは与えられた時間定電流に付されるか、完全な対合に影響しない誤対合を変性する限定されたパワーレベルで定電流に付される。

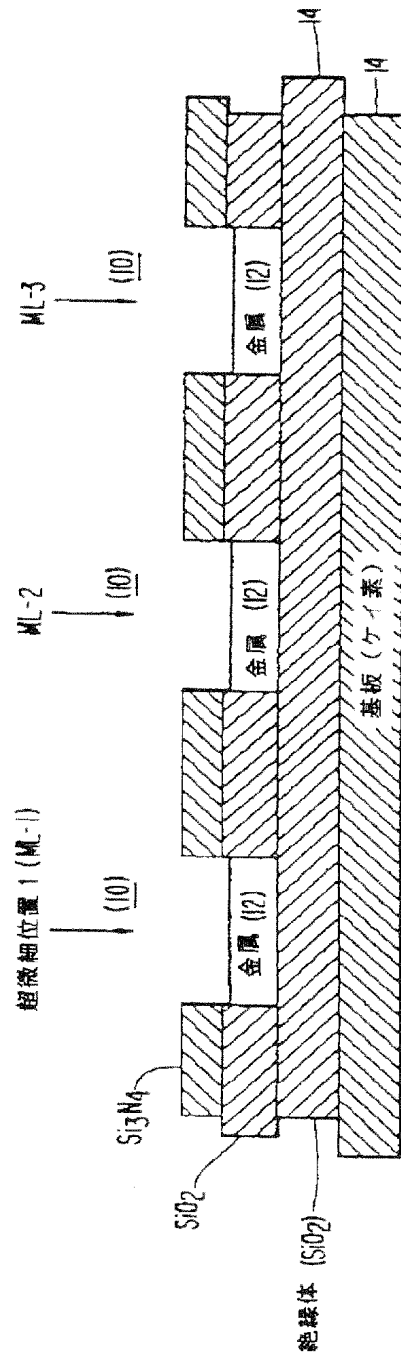
Ras-G	5' - GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU -3'
Ras-1	3' - CC GCG GCC GCC ACA C - アミノリンク2 -5'
Ras-2	3' - CC GCG GCA GCC ACA C - アミノリンク2 -5'
Ras-3	3' - CC GTG GCA GCC ACA C - アミノリンク2 -5'
Ras-T	5' - GGT GGT GGG CGC CGT CGG TGT GGG CAA GAU -3'

微小電極は他に記載されたマイクロキャピラリーチューブから製造された。結合本体Ras-Gは過ヨウ素酸酸化され、アドレスされた微細位置に共有結合される。Ras-G微細位置を、次いで、完全な対合であるRas-1-TRと、

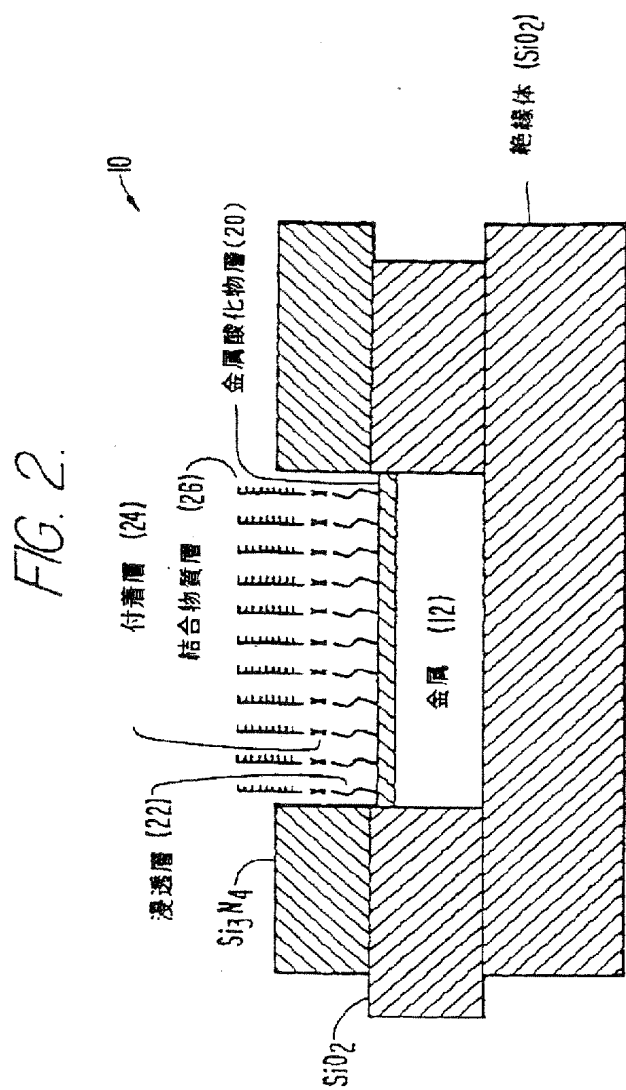
1塩基対の誤対合（G-A）であるR a s-2-T R、または2塩基対の誤対合（G-AおよびG-T）であるR a s-3-T Rとハイブリダイズさせる。微細位置を、相補的配列がハイブリダイズするか、またどの程度かを変化させるために蛍光的に試験した。マイクロキャピラリーを再びのせ、完全にマッチしたハイブリッドに顕著に影響せず、ミスマッチのハイブリッドが除去されるまで定電流に制御された時間さらす。

結果は、厳格性が電気泳動的ポテンシャルによって影響され得ることを示す。この実施例は、それぞれの微細位置がそれぞれの厳格性対照を持つことが出来、したがって、1の通常の厳格性レベルに限られてきた大規模な平行するプロセッシングへの主たる障害に打ち勝つことを示す。

FIG. 1.

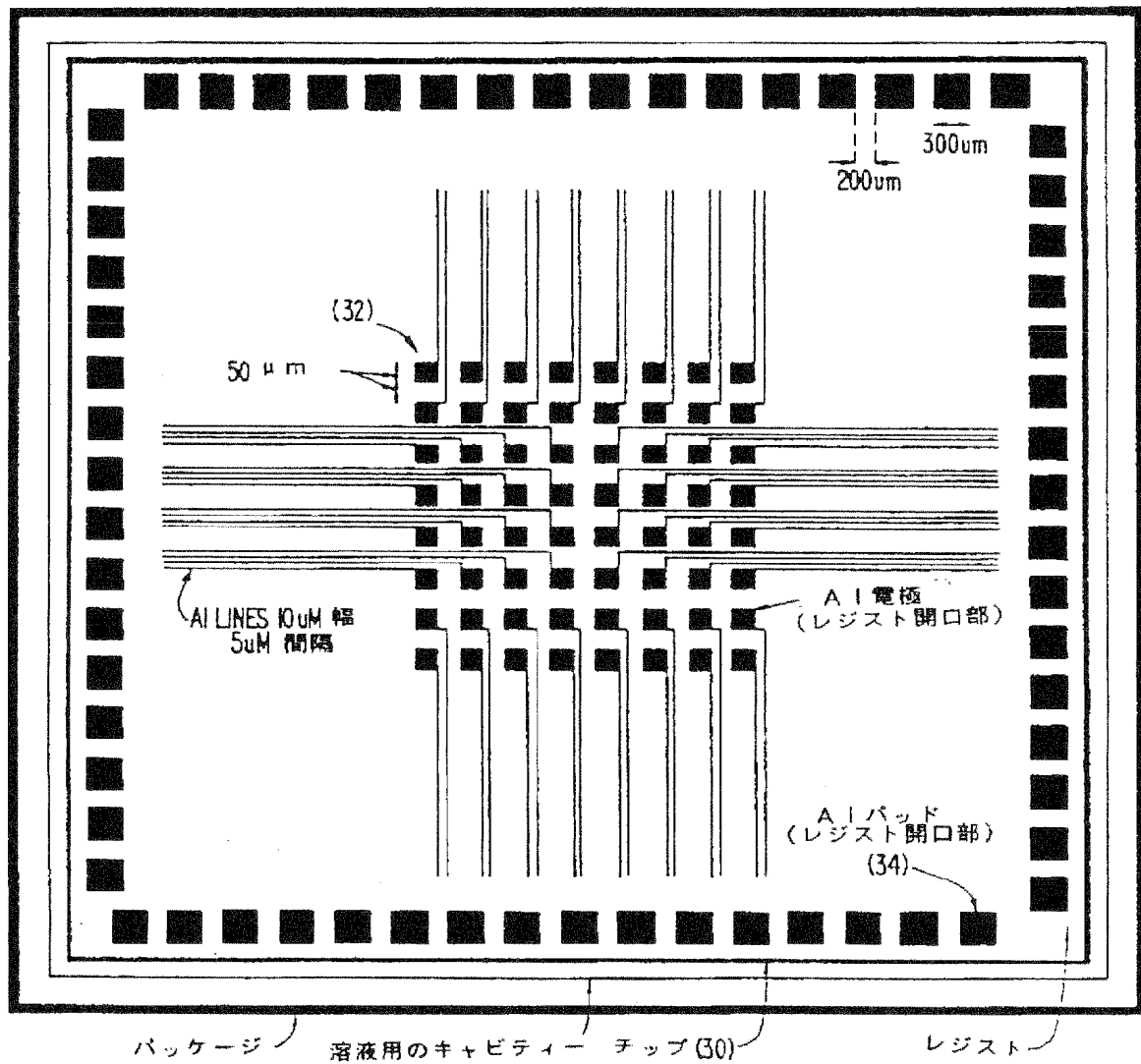


【図2】

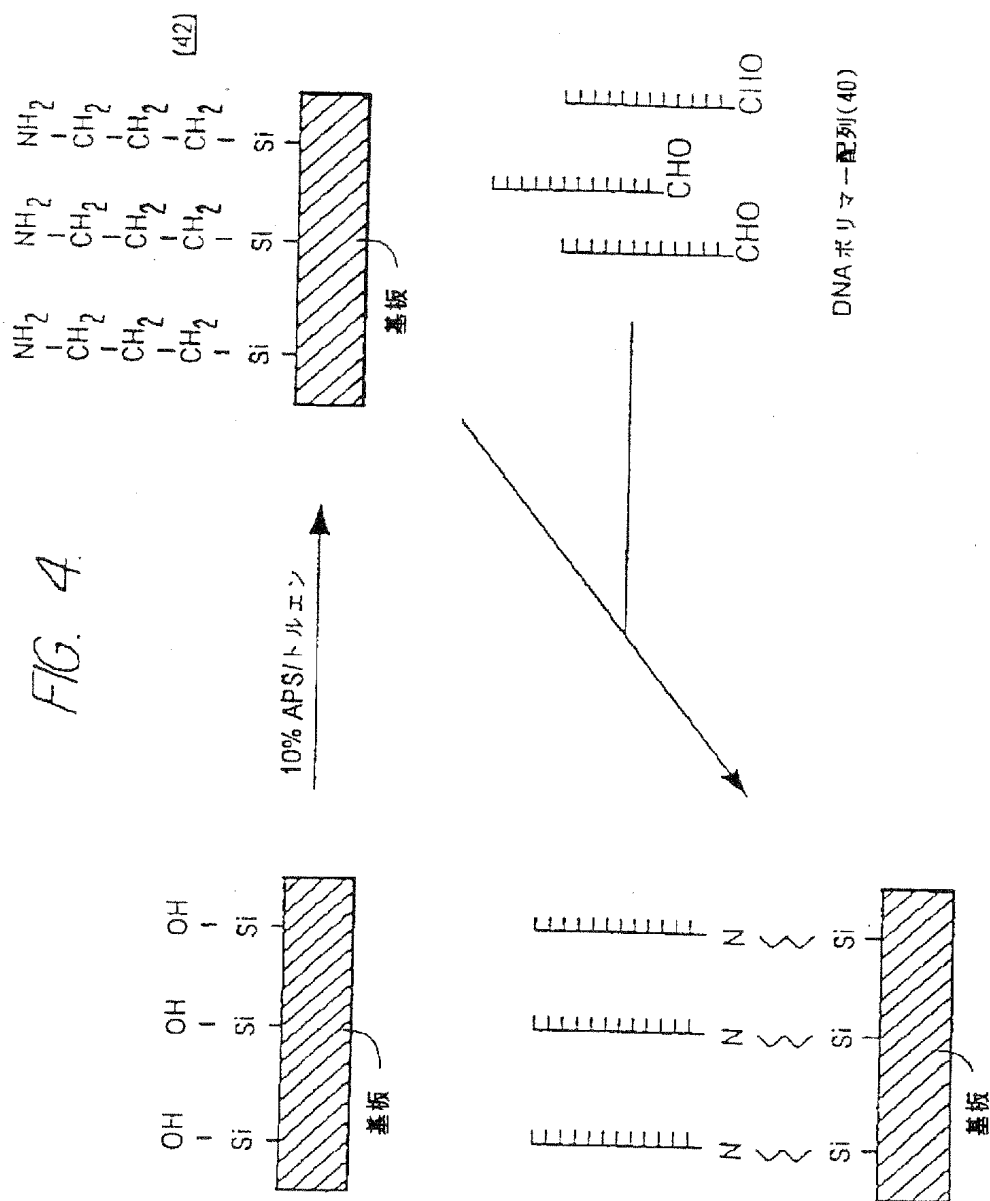


【図3】

FIG. 3.



【図4】



【図5】

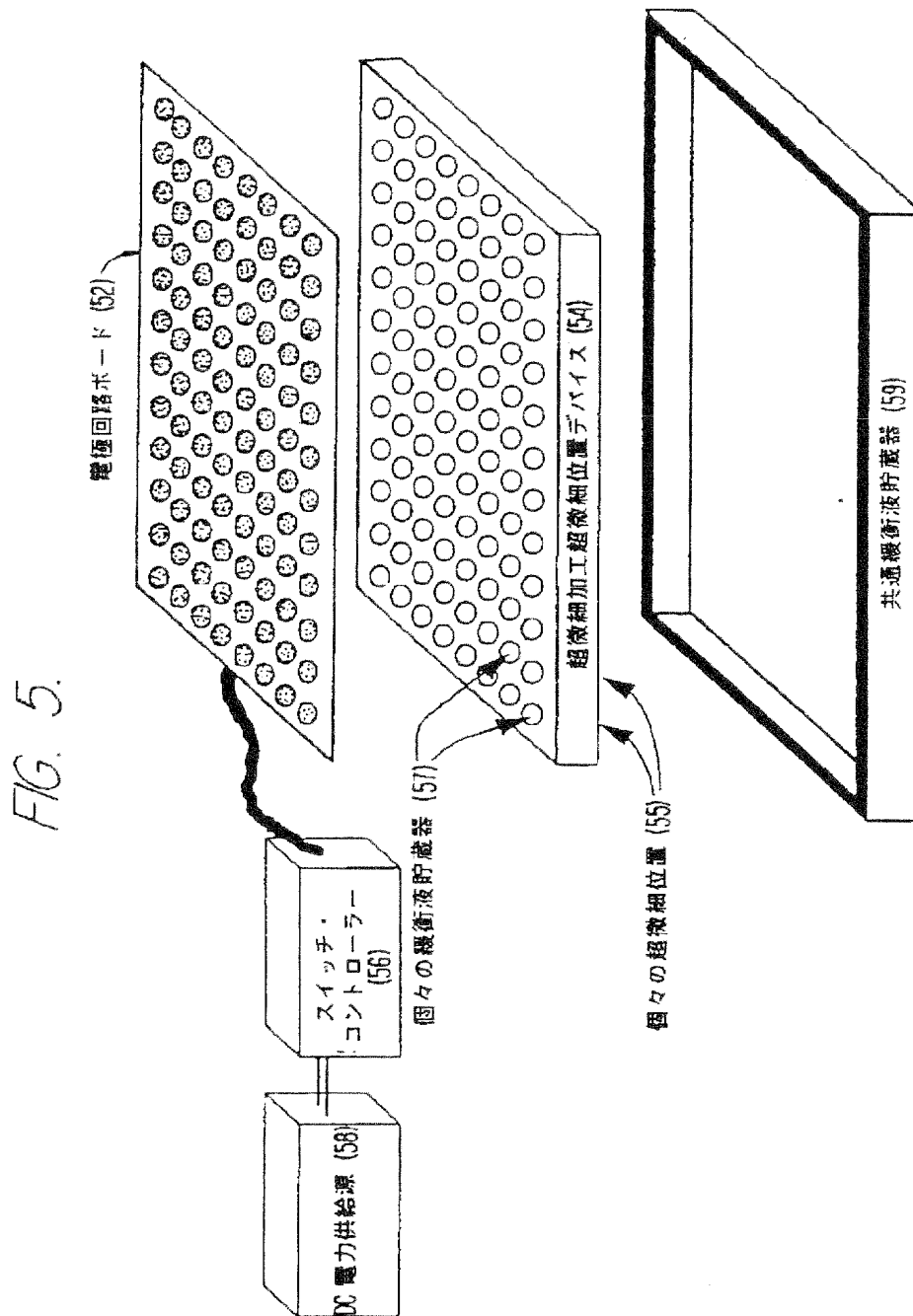
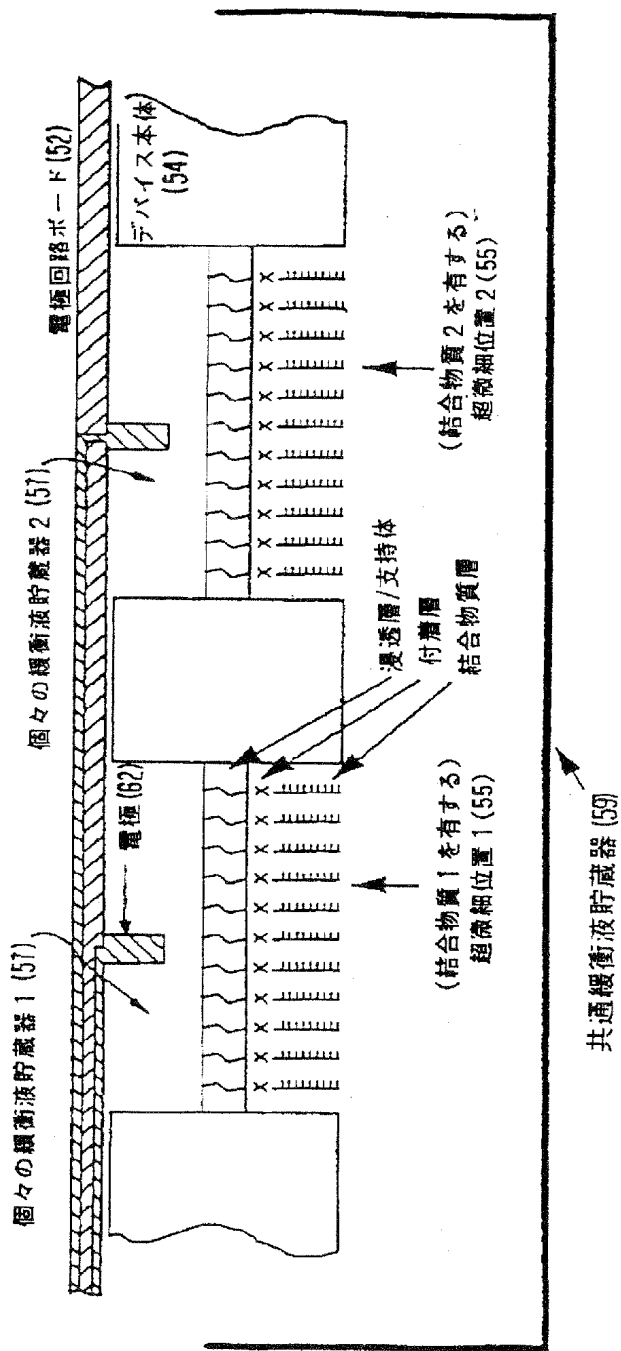


FIG. 6.



【図7】

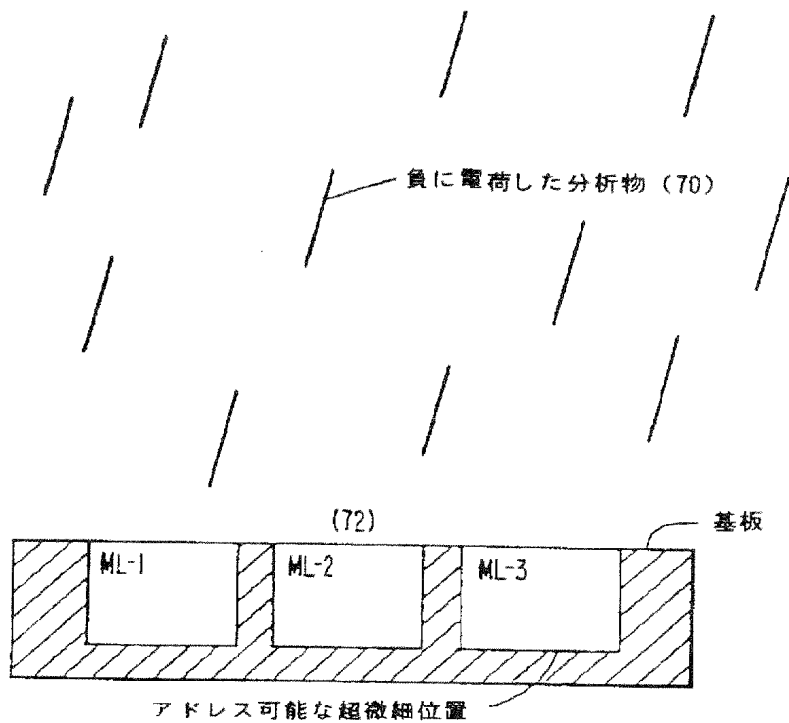


FIG. 7a.

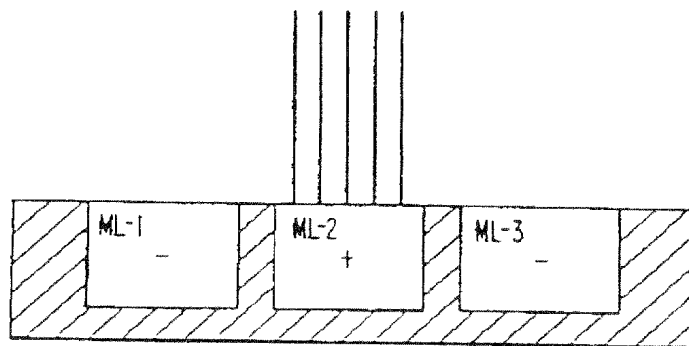
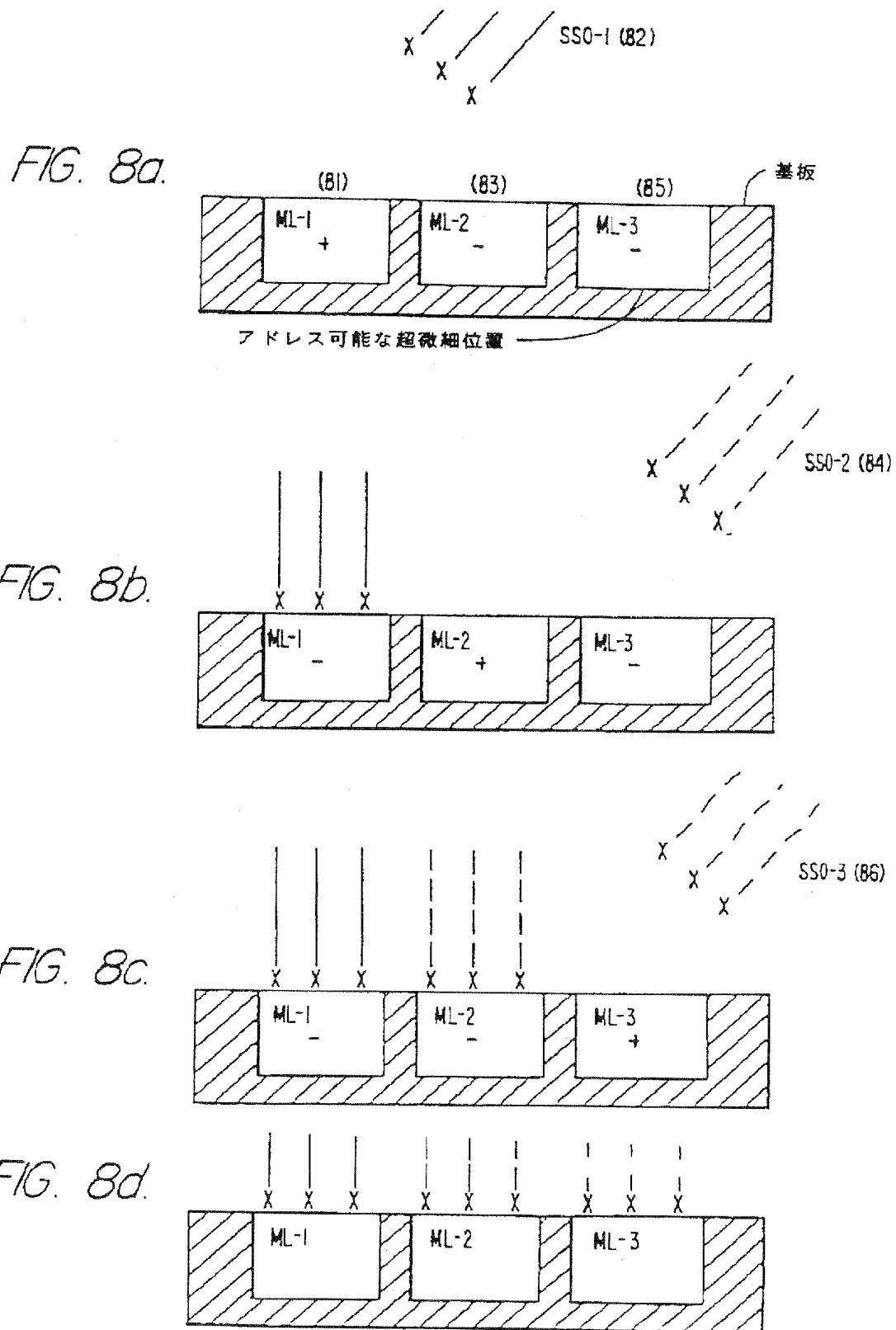
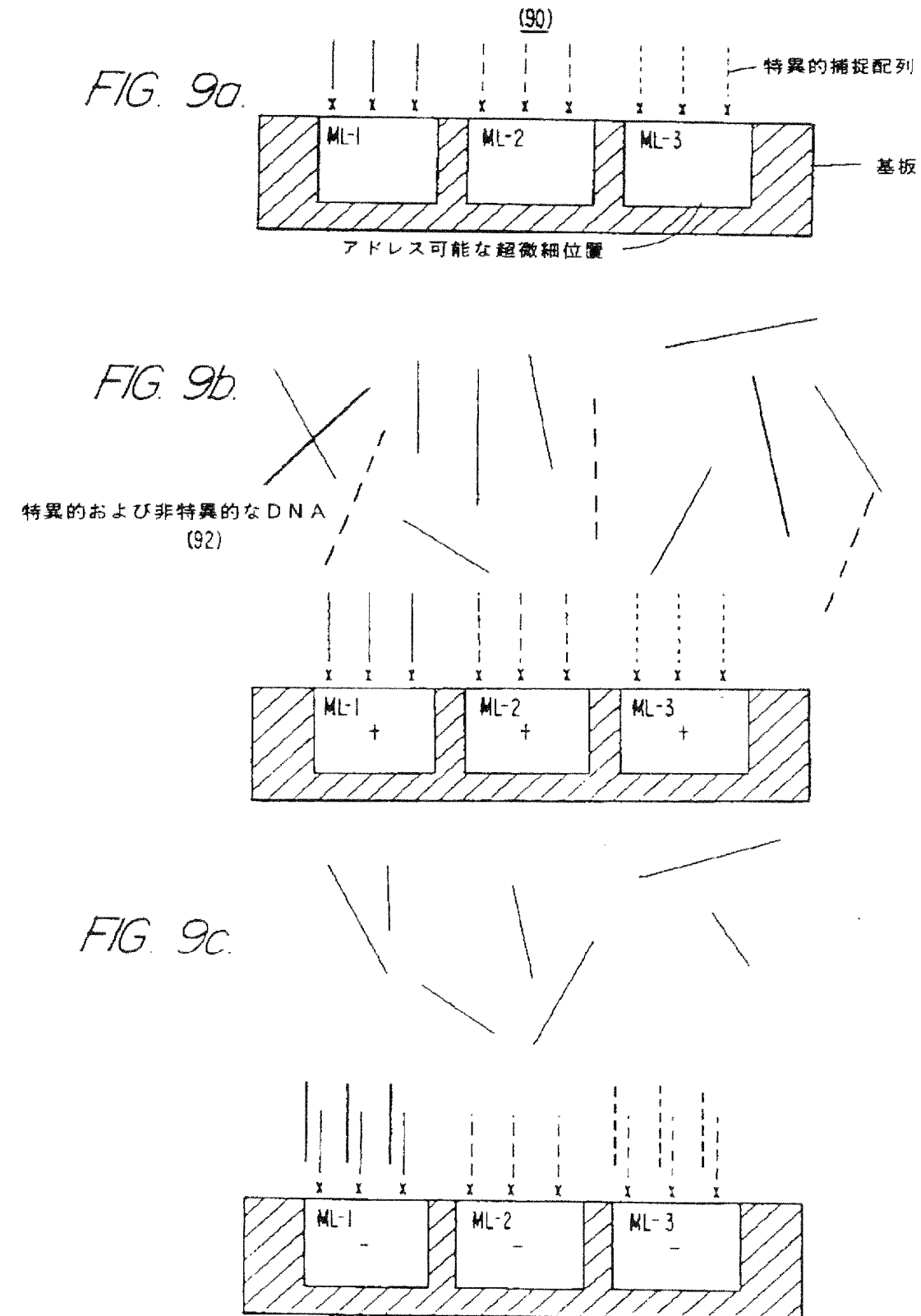


FIG. 7b.

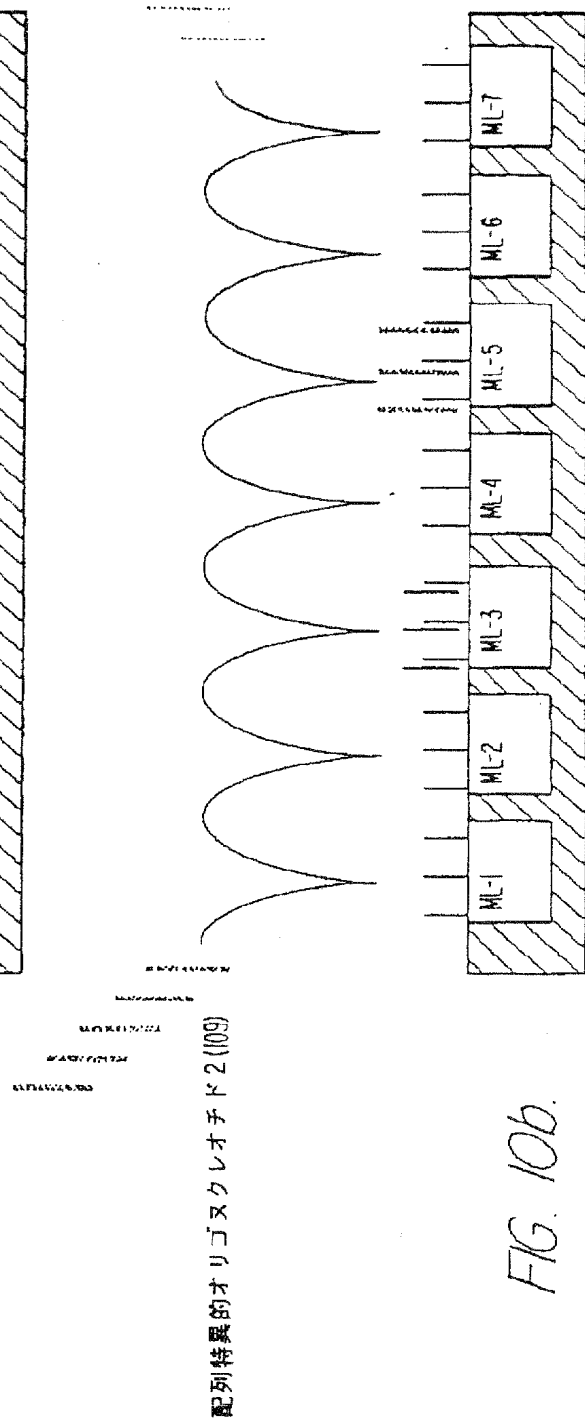
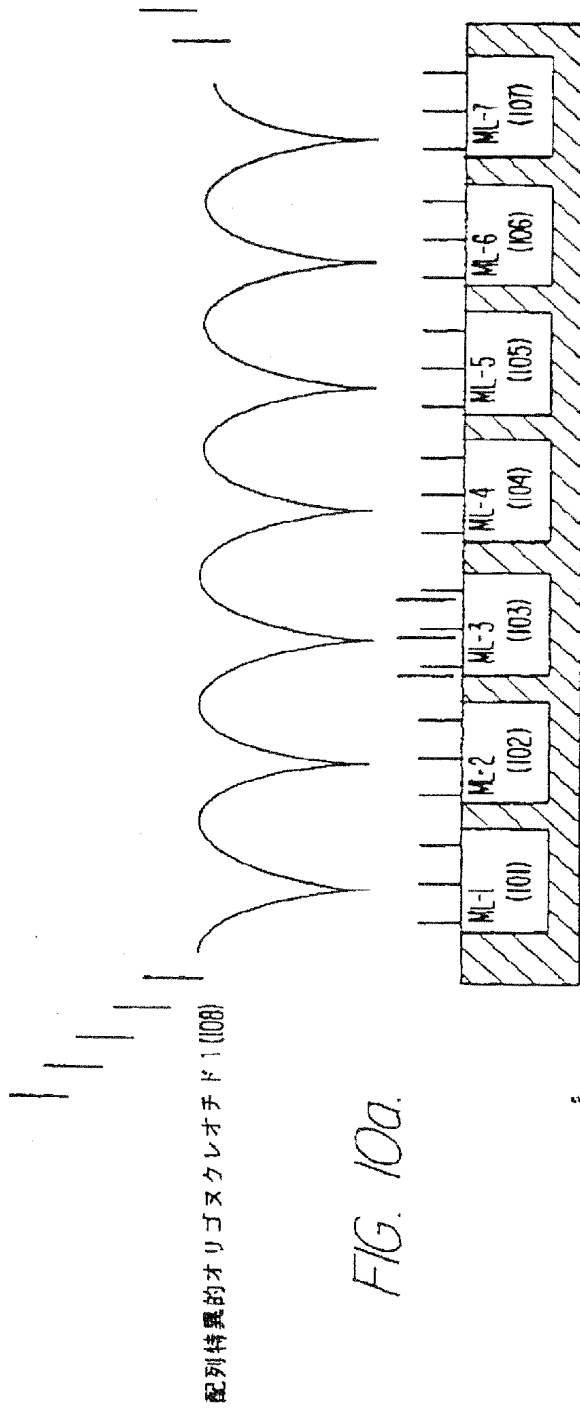
【図8】



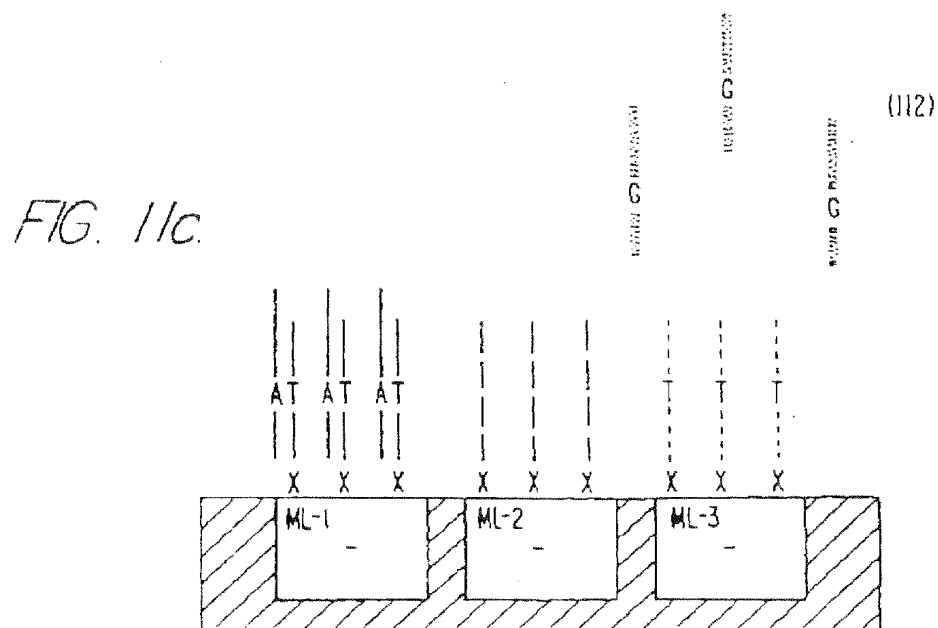
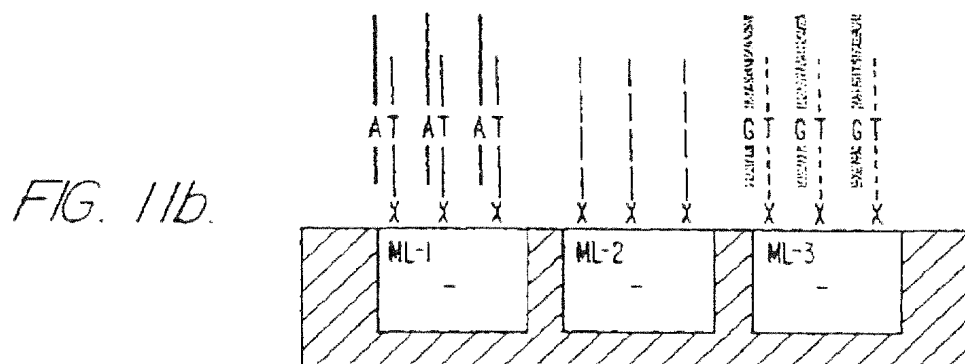
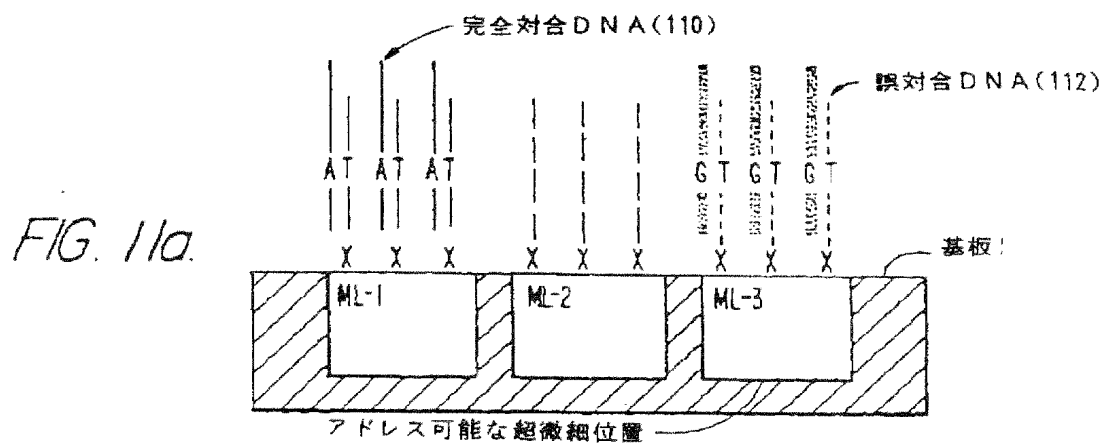
【図9】



【図10】



【図11】



【図12】

FIG. 12a.

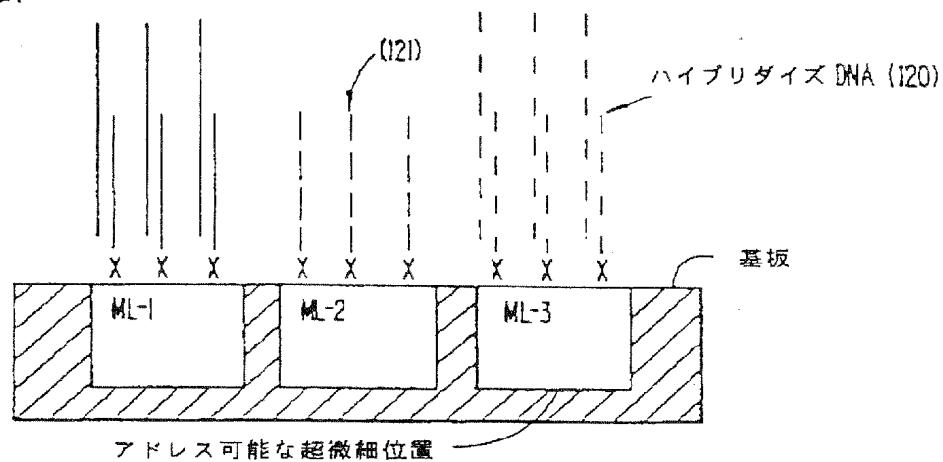
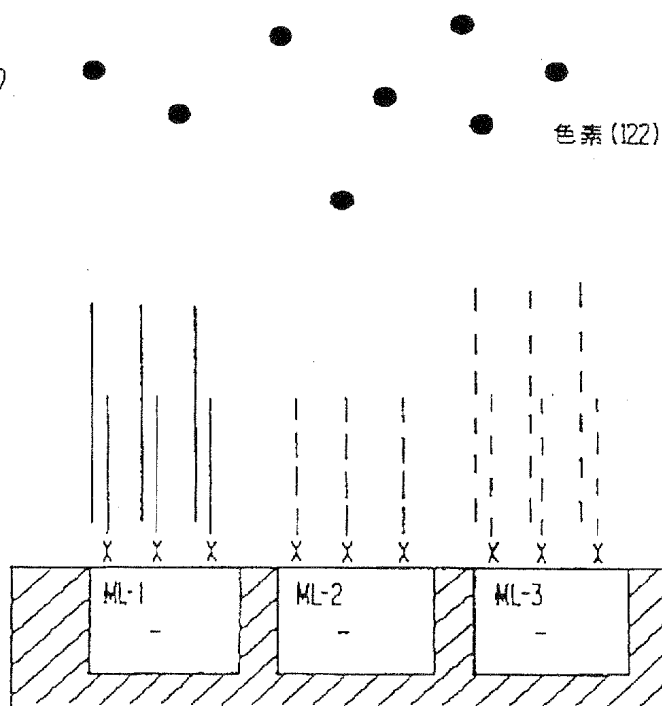


FIG. 12b.



【図12】

FIG. 12c.

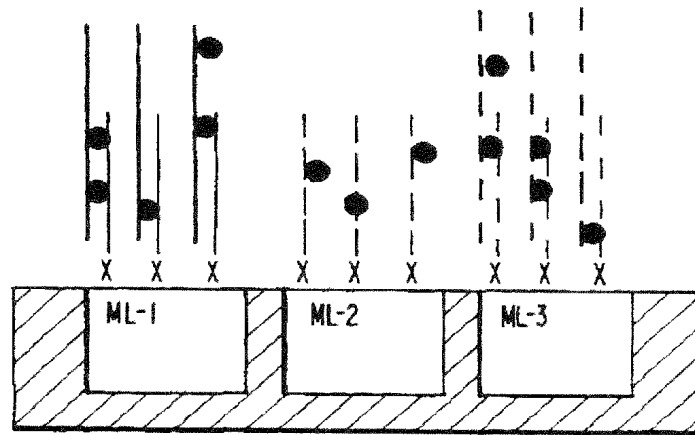
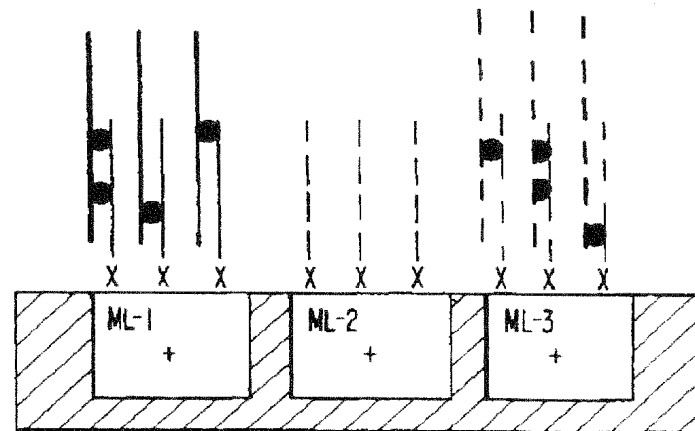


FIG. 12d.



【図13】

FIG. 13a.

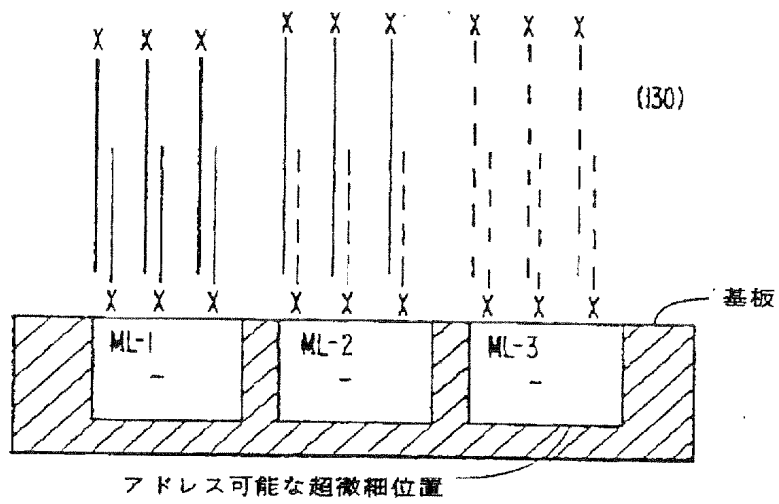
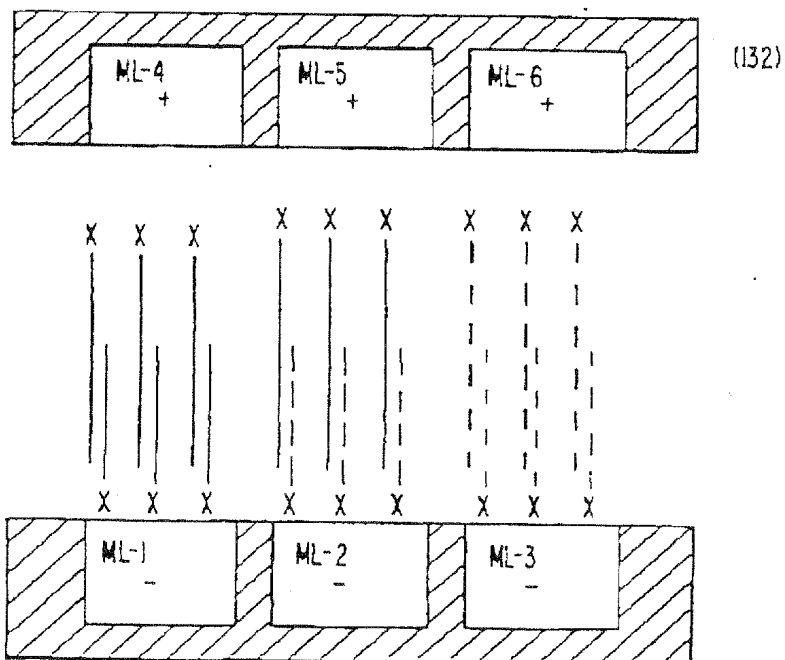
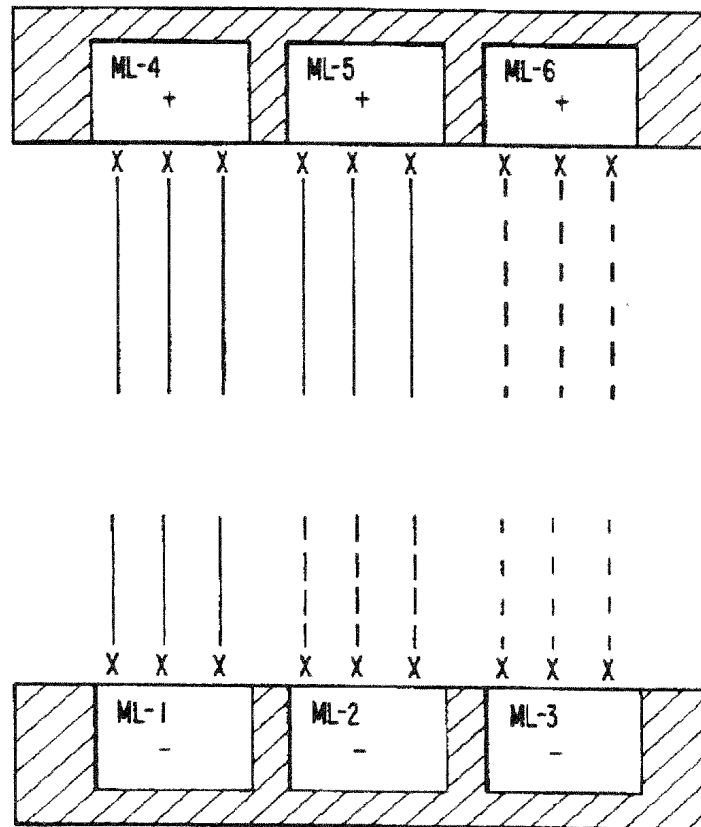


FIG. 13b.



【図13】

FIG. 13c.



【図14】

FIG. 14a.

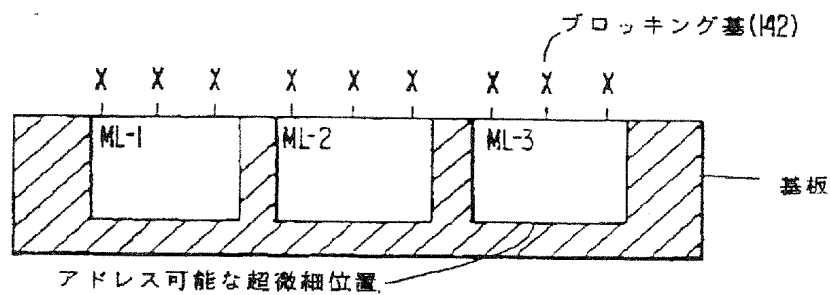


FIG. 14b.

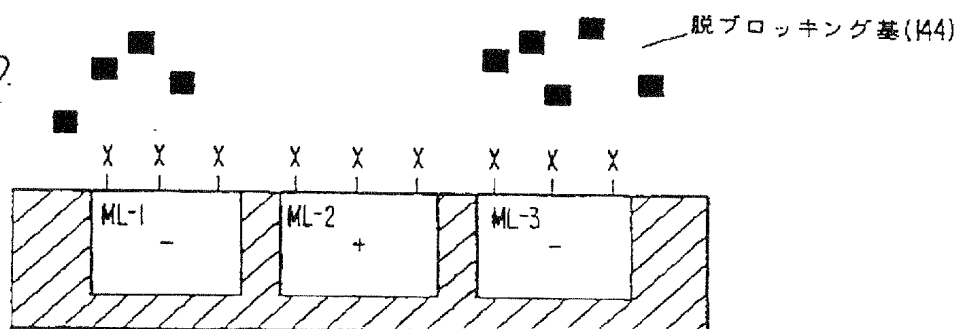


FIG. 14c.

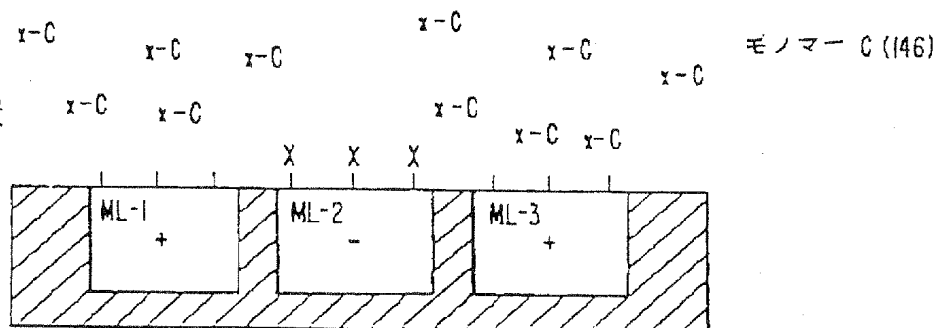


FIG. 14d.

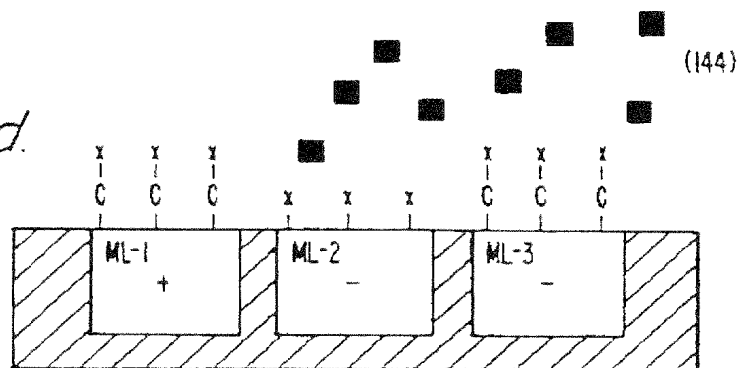


FIG. 14e.

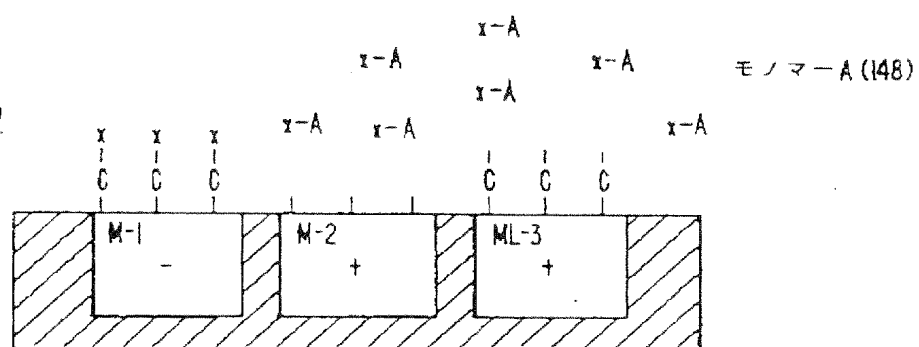
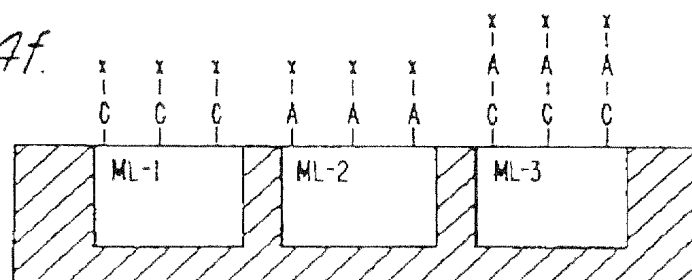


FIG. 14f.



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/12270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 21/00, 30/00, 33/53; C07H 21/00; C12Q 1/68 US CL : 422/57, 69; 435/6.7.1; 536/25.3, 25.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US, A, 5,227,265 (DEBOER ET AL.) 13 JULY 1993, see especially the abstract and Figures 1-13.	1-11, 13, 16-24, 27-32, 44-48 ----- 12, 14, 15, 25, 26, 33, 34
Y	US, A, 3,950,738 (HAYASHI ET AL.) 13 APRIL 1976, see especially the abstract and claims 1-19.	1-34, 44-48
X	US, A, 4,816,418 (MACK ET AL.) 28 MARCH 1989, see especially claims 1-15.	44-48
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 FEBRUARY 1995		Date of mailing of the international search report 24 FEB 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer ARDIN MARSCHEL Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US94/12270

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US, A, 5,075,077 (DURLEY, III ET AL.) 24 DECEMBER 1991, see especially claims 1-24.	1-13, 15-24, 27-32, 44-48 ----- 14, 25, 26, 33, 34
X	US, A, 4,580,895 (PATEL) 08 APRIL 1986, see especially claims 1-13.	44-48
Y	US, A, 5,125,748 (BJORNSEN ET AL.) 30 JUNE 1992, see especially claims 1-19.	44-48
Y	US, A, 5,164,319 (HAFEMAN ET AL.) 17 NOVEMBER 1992, see especially Figures 1-4C and claims 1-10.	1-34
X --- Y	US, A, 5,234,566 (OSMAN ET AL.) 10 AUGUST 1993, see especially the abstract, Figure 2, and claims 1-38.	1-13, 15-24, 27-32 ----- 14, 25, 26, 33, 34
X --- Y	US, A, 5,096,807 (LEABACK) 17 MARCH 1992, see especially the abstract, Figures 1-7, and claims 1-48.	1-13, 15-24, 27-32 ----- 14, 25, 26, 33, 34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/12270

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1))(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12270

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched
Classification System: U.S.

422/50, 52, 56, 57, 58, 62, 68.1, 69, 82.01, 82.05, 82.06, 82.07, 82.08, 82.09; 435/4, 5, 6, 7.1, 810; 436/501, 63, 72; 536/25.3, 25.4

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

CAS, BIOSIS, MEDLINE, WORLD PATENT INDEX, BIOTECH ABSTRACTS.
search terms: hybridization, biochip, array, charge, detection, DNA, nucleic

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-34, drawn to electronic devices with a substrate and a permeation layer.

Group II, claims 35-39, drawn to methods of electronically controlling hybridization of DNA.

Group III, claim 40, drawn to a method of actively transporting DNA.

Group IV, claim 41, drawn to an electronically controlled method for combinatorial synthesis of a biopolymer.

Group V, claims 42 and 43, drawn to a method for replicating a self-addressable electronic device.

Group VI, claims 44-48, drawn to systems for the detection of fluorescent or colorimetric binding reactions and assays

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group I is directed to devices with a substrate and permeation layer but contain no recited limitation that directs either their making or use to any other group per se. It is noted that binding entities are cited in claim 23, for example, but without any limitation that limits their use or preparation or directs same to another invention group as claimed. Binding entities are also well known and not deemed a special technical feature. Group I therefore lacks a special technical feature that links the claimed devices to any other invention group. Group II is directed to hybridization control but cites no limitation directed to any of Groups III-VI. That is, hybridization is not cited as a special technical feature for the transport of Group III etc. Group III is directed to transport of DNA but does cite synthetic limitations as its use etc. as cited in Groups IV etc. therefore also lacking a special technical feature that links Group III to the other Groups. Group IV is directed to biopolymer synthesis via directing monomers to selected locations on a substrate where a synthetic reaction can occur. Groups V and VI lack any biopolymer synthesis limitations thus causing Group IV to lack a common special technical feature with Groups V and VI. Group V is directed to replication of devices by hybridization reactions. No such hybridization reactions are cited as limitations in Group VI. Therefore Group V lacks a special technical feature in common with Group VI thus supporting a lack of unity. In summary, as discussed above all of Groups I-VI are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
G O 1 N 33/566		9162-4 B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
H O 5 K 1/02		0275-2 J	G O 1 N 27/26	3 3 1 Z

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第7部門第2区分

【発行日】平成14年3月19日(2002.3.19)

【公表番号】特表平9-504910

【公表日】平成9年5月13日(1997.5.13)

【年通号数】

【出願番号】特願平7-513281

【国際特許分類第7版】

H01L 51/00
C12N 15/09 ZNA
C12Q 1/68
G01N 21/64
27/447
33/566
H05K 1/02

【F I】

H01L 29/28
C12Q 1/68 Z
G01N 21/64 Z
33/566
H05K 1/02 A
C12N 15/00 ZNA A
G01N 27/26 331 Z

手続補正書

平成13年11月5日

特許庁長官様

1. 事件の表示

平成07年特許第281132号1号

2. 補正をする者

名称 ナンテン、インコーポレイテッド

3. 代理人

住所 〒100-0001
東京都千代田区中央1丁目3番1号 3F トレッド
特許法律事務所
電話 (03) 5849-1261
FAX (03) 5849-0261

氏名 井野上 (印) 青山 宏



4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の概要

図表の通り

(3) 図表

補正した請求の範囲

- 基板、
基板により支持された第1の選択的にアドレス可能な電極、
第1の選択的にアドレス可能な電極に隣接して配置された絶縁層、
第1の選択的にアドレス可能な電極に形成された電極層、および
電極層に隣接した付着層
よりなる自己アドレス可能な電子デバイス。
2. 基板により支持されている第2の選択的にアドレス可能な電極をさらに包含する請求項1の電子デバイス。
3. 絶縁層上に配置された付着層をさらに包含する請求項1または2の電子デバイス。
4. 基板がベースおよびその上に存在する絶縁材を包含する請求項1の電子デバイス。
5. 基板が以下の群：シリコン、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチック、またはセラミック材から選択される請求項1の電子デバイス。
6. ベースが以下の群：シリコン、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチック、またはセラミック材から選択される請求項4の電子デバイス。
7. ベース材がシリコンである請求項4の電子デバイス。
8. 絶縁材が二酸化ケイ素である請求項4の電子デバイス。
9. 基板が絶縁パターンのまたはボードからなる請求項1の電子デバイス。
10. 第1の選択的にアドレス可能な電極および第2の選択的にアドレス可能な電極が基板により支持された絶縁材により分離されている請求項2の電子デバイス。
11. 絶縁材が以下の群：二酸化ケイ素、プラスチック、ガラス、レジスト、ゴム、またはセラミック材から選択される請求項10の電子デバイス。
12. 二酸化ケイ素が絶縁材上に配置されている請求項10の電子デバイス。

- 1 3. 電極部が固定部である請求項1の電子デバイス。
- 1 4. 浸透層がアミノプロピルトリエトキシシリコンである請求項1の電子デバイス。
- 1 5. 浸透層および選択的にアドレス可能な電極がバンプ層により分離されている請求項1の電子デバイス。
- 1 6. 電極が以下の群：アルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、半導体材料、およびそれらの混合物から選択される請求項1の電子デバイス。
- 1 7. 基板、
基板上に配置された複数の選択的にアドレス可能な電極、
電極部、
電極部からの選択的電流経路を提供する、電極へ電氣的接続、および
アドレス可能な結合位置を形成する、各電極に隣接した浸透層
からなる自己アドレス可能な電子デバイス。
- 1 8. さらに電流経路を該アドレス可能な電極に選択的に接続するためのシフトコントロールからなる請求項1 7の電子デバイス。
- 1 9. さらにアドレス可能な結合位置を形成する、該浸透層上に配設された付着層からなる請求項1 7の電子デバイス。
- 2 0. 電極部が以下の群：アルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、半導体材料、およびそれらの混合物から選択される請求項1 7の電子デバイス。
- 2 1. 該電極の選択的にアドレス可能な電極間に配置された電子絶縁部をさらに包含する請求項1 7の電子デバイス。
- 2 2. 複数のアドレス可能な結合位置がアレイ中に配置されている請求項1 7の電子デバイス。
- 2 3. 結合物質、試薬、および分析物を含有する溶液を提供するための容器をさらに包含する請求項1 7の電子デバイス。
- 2 4. 特異的結合物質が選択的に輸送され、該アドレス可能な結合位置に結合

しており、アドレスされた能動的位置デバイスを形成する請求項1 7の電子デバイス。

2 5. デバイス上の結合位置の幅が0.5ミクロンないし200ミクロンの間である請求項1 7の電子デバイス。

2 6. デバイス上の結合位置の幅が5ミクロンないし100ミクロンの間である請求項1 7の電子デバイス。

2 7. 基板、

基板上に配置された複数の選択的にアドレス可能な電極、

電極部、

電極部からの選択的電流経路を提供する、電極への電氣的接続、

該電極に隣接した個々のバンプ層、付着層、

アドレス可能な結合位置を形成する、該個々のバンプ層、付着層に隣接して配設された個々の浸透層

からなる自己アドレス可能な電子デバイスであって、デバイス上の位置の幅が100ミクロンないし5ミリメートルの範囲である該電子デバイス。

2 8. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを結合位置に対して電子工学的に判断する方法であって、以下の工程：

下に存在する第1の電極を包含する第1の結合位置および下に存在する第2の電極を包含する第2の結合位置に接触させて溶液を置き；

該第1の結合位置を該第2の結合位置に対して正電位に置き、該第1の位置表面上でDNAを濃縮し；次いで、

該第1の結合位置を該第2の結合位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1の結合位置から非特異的結合DNA配列を除去するに十分であるが特異的結合DNA配列を除去するには十分でないことを特徴とする方法。

2 9. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを第1および第2の結合位置に対して電子

工学的に判断する方法であって、以下の工程：

第1、第2、および第3の位置に接触させて溶液を置き；

該第1および第2の結合位置を正の電位に置き、該第3の位置を負の電位に置き、該第1および第2の位置においてDNAを濃縮し；

該第1および第2の特異的結合位置を負の電位に置き、該第3の位置を正の電位に置き；次いで、

該第1および第2の結合位置を該第3の位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1および第2の位置から非特異的結合DNA配列を除去するに十分であるが特異的結合DNA配列を除去するには十分でないことを特徴とする方法。

3 0. 特異的結合DNA配列および非特異的結合DNA配列を含有する溶液からのDNAのハイブリダイゼーションを第1の結合位置、次いで、第2の特異的結合位置に対して電子工学的に判断する方法であって、以下の工程：

該第1、第2、および第3の位置に接触させて溶液を置き；

該第1の結合位置を正の電位に置き、該第2の結合位置を負の電位に置き、該第1の位置においてDNAを濃縮し；

該第1の結合位置を負の電位に置き、該第2の結合位置を正の電位に置き、該第2の位置においてDNAを濃縮し；次いで、

該第1および第2の結合位置を該第3の結合位置に対して負の電位に置き、ここに、該負の電位または電流が該第1および第2の位置から非特異的結合DNA配列を除去するに十分であるが特異的結合DNA配列を除去するには十分でないことを特徴とする方法。

3 1. 該負の電位または電流が漸次増加または減少される請求項3 0のハイブリダイゼーション法。

3 2. 複数の特異的および非特異的DNA配列が結合位置のアレイに配置される請求項2 9または3 0の方法。

3 3. DNAを溶液から電極の位置へ能動的に輸送する方法であって、以下の工程：

DNAを含有する溶液を第1、第2、第3、およびn個の位置と接触させて置き；

他の位置に対して正の電位を該第1の位置に提供し、DNAを該第1の位置に輸送し；

該第1の位置に対して正の電位を該第2の位置に提供し、DNAを該第2の位置に輸送し；

該第2の位置に対して正の電位を該第3の位置に提供し；次いで、

該プロセスを他の位置すべてについて繰り返すことを特徴とする方法。

3 4. 生体素分子の組み合わせ合成のための電子工学的に制御された方法であって、以下の工程：

それぞれが個々に電子工学的にアドレス可能な複数の反応位置を基板上に形成し；

各反応位置上に付着層を形成し；

該反応位置を初等モノマーA含有溶液と接触させて置き；

反応Aが起こるようによりこれらの位置をモノマーAと逆の電荷に選択的に偏極させ、反応Aが起こらないようにこれらの位置をモノマーAと同じ電荷に偏極させ；

特定のA位置においてモノマーAを濃縮し反応させ；

非反応モノマーA含有溶液を除去し；

該反応位置を前等モノマーB含有溶液に接触させて置き；

反応Bが起こるようによりこれらの位置をモノマーBと逆の電荷に選択的に偏極させ、反応Bが起こらないようにこれらの位置をモノマーBと同じ電荷に偏極させ；

特定のB位置においてモノマーBを濃縮し反応させ；次いで、

すべての生体素分子配列が完成するまでモノマーA、モノマーB、ないしモノマーDについてn回反応を繰り返すことを特徴とする方法。

3 5. 特定のDNA配列でアドレスされた自己アドレス可能な電子デバイスを構築する方法であって、以下の工程：

マスター自己アドレス可能電子デバイス上にアドレスされた特定のDNA配列に相補的な配列をハイブリダイゼーションさせ、

受容自己アドレス可能電子デバイス上のアドレスされていない位置を、該マスターデバイス上のアドレスされた位置に置き、次いで、

該マスターデバイスの位置を食に模倣し、該受容デバイス上の位置を正に模倣し、相補的配列を該受容デバイスに輸送させることを特徴とする方法。

5.15. さらにマスター鎖型からの相補的配列を再生させることからなる、請求項15のマスター二重配列の複製方法。

5.17. 8個またはそれ以上のアドレス可能な位置；および

少なくとも1個の該位置に隣接して配置された検出システム

からなる、蛍光または比色分析法による結合反応およびアッセイの検出システム。

5.18. 検出器が以下の群：フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、または光電子倍增管から選択される光電子的検出器である請求項17の検出システム。

5.19. 検出器が以下の群：荷電カップルドデバイス、冷却された荷電カップルドデバイス、増強された荷電カップルドデバイス、またはマイクロチャンネルデバイスから選択されるオプトエレクトロニクス的イメージング検出器である請求項17の検出システム。

4.Q. 検出器が蛍光検針のエミッシェロンを検出するものである請求項17の検出システム。

4.1. 検出器が分光分光学的輻射の収収を検出するものである請求項17の検出システム。